

Die Sauerstoffversorgung der Retina bei Knochenfischen:
Entwicklung methodischer Ansätze bei der Regenbogenforelle,
Oncorhynchus mykiss (Walbaum)

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biol. Wolfgang Waser

09.12.1966, St. Tönis, jetzt Tönisvorst

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Professor Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Professor Dr. Bernhard Ronacher

- | | |
|---------------|---------------------------------|
| 1. Gutachter: | Professor Dr. Norbert Heisler |
| 2. Gutachter: | Professor Dr. Bernd Pelster |
| 3. Gutachter: | Professor Dr. Andreas Elepfandt |

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 2001

Experience varies directly with equipment ruined.

Horner's Five Thumb Postulate

Nothing ever gets build on schedule or within budget.

Cheops Law

Danksagung

Ich danke herzlichst:

- Herrn Professor Dr. Norbert Heisler für ständige Gesprächsbereitschaft und anregende Diskussionen, sowie für die Begutachtung der Dissertation. Durch seine bereitwillige Unterstützung hat er die Durchführung der Arbeit erst ermöglicht.
- Herrn Dr. Stefan K. Hetz für zahllose Anregungen insbesondere auch auf dem mir vormals unbekannten Gebiet der analogen Elektronik; und für die Weisheit, nicht durch endlose theoretische Belehrungen zu langweilen, sondern mich das meiste selber herausfinden zu lassen.
- Herrn Dr. Michael Berenbrink für „*deep insight*“ in manche hintergründigen physiologischen Prozesse und seinen phänomenalen Literaturüberblick zu vielen Themen, die für meine Arbeit von Bedeutung waren.
- meinen „*Brothers in Arms*“ Herrn Dipl.-Biol. Andreas Mölich und Herrn Dipl.-Biol. Alexander Kaiser für lange, auch mal philosophische Diskussionen und für die vielen Tipps und Tricks, die sich im weiteren Verlauf der Experimente oft als unbezahlbar herausgestellt haben.
- Herrn Dipl.-Biol. Arnold Stern für geduldige Hilfe und Unterstützung bei allen Computer- und Software-Problemen und für akribische, erfolgreiche Fehlersuche bei Gerätedefekten, wodurch eine Menge Geld und Zeit eingespart wurden.
- Herrn Rüdiger Karpinski für sorgfältigste Anfertigung diffiziler Einzelstücke, ohne die die Durchführung sämtlicher Experimente schwer gelitten hätte; Frau Brigitte Geue für kompetente Hilfe im Labor, die einige Versuche überhaupt erst ermöglicht hat; Frau Hannelore Schöder für die Anfertigung von Sauerstoffmikroelektroden und als sichere Quelle bei Fragen chemischer Natur; Frau Sabine Thiel, Frau Susanne Grübel und Frau Gabriele Ziermann für die in letzter Konsequenz dann doch vergebliche Pflege der Versuchstiere (Rezept für „*Forelle blau*“ im Anhang).

Ich danke weiterhin Herrn Professor Dr. Bernd Pelster und Professor Dr. Andreas Elepfandt für die Begutachtung dieser Arbeit.

Außerdem danke ich den folgenden und allen Personen, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben:

Professor Dr. Valerie Alder (University of Western Australia), Dr. Hans Bäumler (Universitätsklinikum Charité), Jana Fritze, RG, Dipl.-Biol. Sandra Hartzendorf (Universitätsklinikum Charité), Dr. Chris Hogg (University of London), Dr. Bill Jagger (Monash University, Australia), Roman Klemz, Professor Dr. William K. Milsom (University of British Columbia), Professor Dr. Günter Niemeyer (Univ.-Augenklinik Zürich), Dr. Teruyuki Nakanishi (National Research Institute of Aquaculture, Japan), Professor Dr. Mikko Nikinmaa (University of Turku), Dipl.-Biol. Daria Petzold, Dipl.-Biol. Judith Ressler (Institut f. Gewässerökologie und Binnenfischerei), Dr. Stefan Richter (HU-Berlin), Dipl.-Biol. Anja Schreer (Umweltforschungszentrum Halle-Leipzig), Professor Dr. Chris Secombes (University of Aberdeen), Dr. Wieland Stöckmann (Universität Gießen), Riita Suoranta (University of Helsinki), Dr. Heikki Tuurala (University of Helsinki), Jens Vanselow, Dr. Juha Voipio (University of Helsinki), Dr. Suse Völkel (University of Liverpool), Dipl.-Biol. Annabell Wobschall

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Symbole.....	9
1. Zusammenfassung.....	11
2. Einleitung.....	13
3. Material und Methoden.....	17
3.1 Versuchstiere.....	17
3.2 Anatomische Untersuchungen.....	17
3.2.1 Gefäßausgüsse im Bereich der Pseudobranchie und des Auges.....	17
3.2.2 Darstellung der Retina von Regenbogenforellen.....	18
3.3 Experimente <i>in vivo</i>	18
3.3.1 Künstliche Ventilation.....	19
3.3.2 Chirurgische Präparationen.....	20
3.4 Perfusion isolierter Augen <i>in vitro</i>	29
3.4.1 Blutentnahme und -behandlung.....	30
3.4.2 Bestimmung des Root-Effekts.....	30
3.4.3 Äquilibration von Blutproben für die Augenperfusion.....	31
3.4.4 Augenpräparation.....	32
3.4.5 Augenperfusion und intraretinaler Sauerstoffpartialdruck.....	32
3.5 Analytik.....	34
3.6 Sauerstoffmikroelektroden.....	36
3.6.1 Herstellung.....	36
3.6.2 Testverfahren.....	37
3.6.3 Messverfahren.....	38
3.7 Datenerfassung und -auswertung.....	39
4. Ergebnisse.....	45
4.1 Eigenschaften von Sauerstoffmikroelektroden.....	45
4.2 Gefäßversorgung des Forellenauges.....	47
4.3 Aufbau der Retina.....	48

4.4	<i>In vivo</i> – Versuche: Systemische Parameter.....	50
4.5	Flussrate in der afferenten Arterie der Pseudobranche.....	53
4.6	Augeninnendruck.....	54
4.7	Elektroretinogramm.....	54
4.8	Intraretinaler Sauerstoffpartialdruck und Elektroretinogramm.....	59
4.8.1	Retinales Sauerstoffprofil.....	59
4.8.2	Elektroretinogramm bei intraretinaler Sauerstoffmessung.....	60
4.9	Intraretinaler Sauerstoffpartialdruck bei isoliert perfundierten Augen.....	64
5.	Diskussion.....	69
5.1	Versuchstiere.....	69
5.2	Systemische Parameter.....	69
5.3	Flussrate in der afferenten Arterie der Pseudobranche.....	72
5.4	Intraokularer Druck.....	73
5.5	Intraretinaler PO_2 und Elektroretinogramme <i>in vivo</i>	74
5.6	Perfusion isolierter Augen.....	76
5.7	Physiologie.....	79
5.8	Schlussfolgerung.....	83
6.	Literatur.....	85
	Anhang.....	95
1.	Chemikalien, Lösungen und Medien.....	95
2.	Geräte und Materialien.....	96
1.	Experimente.....	96
2.	Analytik.....	98
3.	Herstellung der Sauerstoffmikroelektroden.....	98
4.	Datenerfassung.....	99

Abkürzungen und Symbole

aPA	afferente Pseudobranchienarterie	O ₂	Sauerstoff
CA	Carboanhydrase	[O ₂] _{Hb}	Konzentration des an Hämoglobin gebundenen Sauerstoffs
CO ₂	Kohlendioxid	P _{DA}	Blutdruck in der dorsalen Aorta
DA	dorsale Aorta	PCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
Hct	Hämatokrit	PO ₂	Sauerstoffpartialdruck
IOP	(<i>intra-ocular pressure</i>) Augeninnendruck	P _{perf}	Perfusiondruck
n	Stichprobenumfang	S.D.	Standardabweichung
MS222	(3-Aminobenzoic acid ethyl ester methane sulfonate) Fischbetäubungsmittel	S.E.M.	(standard <i>error</i> of the <i>mean</i>), Standardfehler
N ₂	Stickstoff	\bar{x}	Mittelwert

Zell- und Gewebsschichten der Retina

PE	Pigmentepithel
PRL	[<i>photoreceptor layer</i>] Schicht der Photorezeptoren: innere und äußere Segmente der lichtempfindlichen Zellen.
OLM	[<i>outer limiting membrane</i>] Äußere limitierende Membran: Trennlinie zwischen den Zellkörpern der Photorezeptorzellen und den lichtempfindlichen Bereichen dieser Zellen.
ONL	[<i>outer nuclear layer</i>] Äußere Körnerschicht: Bereich der Zellkörper (mit Zellkernen) der Photorezeptorzellen.
OPL	[<i>outer plexiform layer</i>] Äußere plexiforme Schicht: Bereich der Axone der Photorezeptorzellen.
INL	[<i>inner nuclear layer</i>] Innere Körnerschicht: Bereich der Horizontal-, Amakrin- und Bipolarzellen.
IPL	[<i>inner plexiform layer</i>] Innere plexiforme Schicht: Bereich der Dendrite der Ganglionzellen.
GCL	[<i>ganglion cell layer</i>] Ganglionzellschicht
NFL	[<i>nerve fiber layer</i>] Axon-Schicht
ILM	[<i>inner limiting membrane</i>] Innere limitierende Membran: Grenzschicht zwischen der Retina und dem Glaskörper.

1. Zusammenfassung

Das Vorkommen von über den Umgebungsdruck erhöhten Sauerstoffpartialdrücken (PO_2) in Geweben ist im Tierreich nur von der Schwimmblase und dem Auge von Knochenfischen bekannt. Die physiologischen Mechanismen dieser Sauerstoffkonzentrierung wurden an der Schwimmblase insbesondere des Aals intensiv erarbeitet, entsprechende Untersuchungen zu den Vorgängen im Auge der Knochenfische fehlen jedoch.

In dieser Arbeit wurde daher eine Methode etabliert, mit der die Sauerstoffkonzentrierung im Auge der Knochenfische an isolierten Augen untersucht werden kann.

1. Das Gefäßsystem der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) wurde durch Gefäßausgüsse dargestellt. Das im Auge gelegene choroidale *Rete mirabile* wird über die *Arteria ophthalmica*, die gleichzeitig die efferente Pseudobranchienarterie darstellt, versorgt. Die Pseudobranchie selber empfängt das Blut aus der efferenten Arterie des ersten Kiemenbogens. Diese Gefäßtopologie, Versorgung der Pseudobranchie mit bereits im ersten Kiemenbogen oxygeniertem Blut und ausschließliche Versorgung des choroidalen *Rete mirabile* mit Blut aus der Pseudobranchie, weist auf die Bedeutung der Pseudobranchie für die Prozesse im Auge hin.
2. Die Retina der Regenbogenforelle wurde mikroskopisch untersucht. Die einzelnen Schichten der Retina entsprechen denen anderer Wirbeltiere. Die Forellenretina ist mit 407 μm aber wesentlich dicker als z.B. die Retina von Säugetieren. Zusätzlich fehlt der Retina der Forelle die bei vielen Säugetieren vorhandene retinale Blutgefäßversorgung. Mit den der Retina am nächsten gelegenen Gefäßen in der Choroidea bestehen bei der Forelle wesentlich größere Diffusionsstrecken von den Blutgefäßen zum Ort des Sauerstoffverbrauchs in den Zellen der Retina als bei anderen Wirbeltieren. Dies wird durch den erhöhten PO_2 in den Choriokapillaren kompensiert.
3. Für die Messung des intraretinalen PO_2 wurden im Rahmen dieser Arbeit Sauerstoffmikroelektroden inklusive der zur Betreibung der Elektroden notwendigen Elektronik entwickelt. Die reaktive Oberfläche der Elektroden vom „*Recess*“-Typ schloss nicht mit dem Ende der Glaskapillare ab, sondern war unter Belassung eines Hohlraumes in der Elektrodenspitze (*Recess*) in das innere der Glaskapillare verlagert. Dadurch waren die Elektroden unempfindlich gegenüber Rühreffekten. Die Mikroelektroden hatten einen Spitzendurchmesser von $< 10 \mu\text{m}$ und eine mittlere Empfindlichkeit von $172 \text{ fA Torr}^{-1} \text{ O}_2$. Die Linearität der Elektroden, ausgedrückt durch den Korrelationskoeffizienten der linearen Regression r über einen Partialdruckbereich von 0 bis 760 Torr O_2 , war besser als 0,9998.
4. Zur Überprüfung des normalen PO_2 in der Retina wurden Regenbogenforellen betäubt und künstlich ventiliert. Systemische Parameter wie arterieller PO_2 , Blutdruck und Herzschlag entsprachen dabei mit im Mittel 99 Torr (arterieller PO_2), 28 Torr (Blutdruck) und 1,23 Hz (Herzschlag) den Werten unbetäubter, freischwimmender Forellen. Lediglich der arterielle pH-Wert war mit 8,02 während der künstlichen Ventilation durch unvollständige Korrektur einer respiratorischen Alkalose gegenüber dem normalen Wert von 7,89 leicht erhöht.
5. Die Auswirkungen der Präparation des Auges zur Messung des intraretinalen Sauerstoffpartialdrucks auf den Augeninnendruck wurde überprüft. Der Augeninnendruck betrug 4,9 Torr. Das Einbringen der Sauerstoffmikroelektrode hatte keine Auswirkung auf den Augeninnendruck. Erst das Entfernen der Elektrode nach der Messung führte zu einer deutlichen Verringerung des Augeninnendrucks.
6. Zum ersten Mal wurde in der vorliegenden Arbeit die Durchblutungsrate des Auges eines Knochenfisches bestimmt. Aus präparatorischen Gründen wurde die Messung an der afferenten Pseudobranchienarterie durchgeführt. Der mittlere Blutfluss in dem Gefäß betrug $216 \mu\text{l min}^{-1}$. Durch Verschluss des

kontralateralen Gefäßes stieg der Fluss auf 135% des ursprünglichen Wertes, da jetzt durch das ipsilaterale Gefäß über die zwischen den beiden Gefäßen bestehende Anastomose beide Augen mit Blut versorgt wurden.

7. Die Funktion der Retina während der intraretinalen Sauerstoffmessung wurde durch Ableitung des Elektoretinogramms kontrolliert. Trotz der während der Versuche fortbestehenden Betäubung mit dem Betäubungsmittel MS222, dem eine negative Wirkung auf das Elektoretinogramm nachgesagt wird, konnten normale Elektoretinogramme aufgezeichnet werden. Die invasive Messung des intraretinalen PO_2 wirkte sich nicht negativ auf die Funktionalität der Retina aus.
8. Der intraretinale PO_2 wurde an betäubten, künstlich ventilierten Forellen gemessen. Der mittlere maximale PO_2 im Bereich der Bruch'schen Membran betrug 382 Torr. An der Innenseite der Retina wurde ein PO_2 von 10 Torr gemessen. Der Bereich des O_2 -Partialdruckgradienten in der Retina, gemessen über den Vorschub der Sauerstoffmikroelektrode vom niedrigsten bis zum höchsten PO_2 , betrug 433 μm , ein Wert der gut mit der mikroskopisch bestimmten Dicke der Retina (407 μm) übereinstimmt.
9. Zur Untersuchung der Einflüsse von Blutparametern auf die Sauerstoffkonzentrierung im Auge der Forelle wurden isolierte Augen künstlich mit verschiedenen Erythrozytensuspensionen perfundiert. Dazu wurde zum einen eine Suspension von Forellenerythrozyten eingesetzt, bei der vorab der Root-Effekt in Abhängigkeit vom pH-Wert der Suspension bestimmt wurde. Bei basischen pH-Werten war das Hämoglobin der Erythrozyten vollständig gesättigt. Bei einem pH-Wert von 7,68 war noch eine Sättigung von 90% vorhanden, die bis zu einem pH-Wert von 7,31 auf 50% abnahm. 10% Sättigung wurden bei einem pH-Wert von 6,94 erreicht. Für die Perfusion wurde die Suspension der Forellenerythrozyten mit einem pH-Wert von 7,48 eingesetzt. Bei diesem pH-Wert liegt die Sättigung bei ca. 82% und eine Änderung des pH-Wertes hat in diesem Bereich eine deutliche Änderung der Sättigung zur Folge, was die Freisetzung von O_2 aus der Bindung an Hämoglobin erleichtert.
Als alternative Perfusionslösung wurde eine Suspension von Humanerythrozyten eingesetzt. Humanhämoglobin weist keinen Root-Effekt auf, es kann also durch die im Auge der Knochenfische vorhandenen Mechanismen kein Sauerstoff freigesetzt werden.
10. Der mittlere intraretinale PO_2 isolierter Augen betrug bei Perfusion mit der Suspension von Forellenerythrozyten 99 Torr. Nach dem Wechsel auf die Suspension mit Humanerythrozyten fiel der intraretinale Sauerstoffpartialdruck sofort auf 30 Torr ab. Der Perfusionsdruck änderte sich bei dieser Umstellung nicht. Bei Perfusion mit Ringerlösung fiel der intraretinale PO_2 auf 20 Torr, gleichzeitig fiel jetzt auch der Perfusionsdruck ab.
11. Eine Erhöhung des intraretinalen PO_2 über die Werte in den Perfusionsmedien konnte bei der künstlichen Perfusion isolierter Augen nicht nachgewiesen werden. Die Notwendigkeit des Root-Effekts für einen hohen Sauerstoffpartialdruck im Auge wird trotzdem deutlich, da bei Perfusion mit einer Suspension von Humanerythrozyten, die einen höheren Sauerstoffgehalt aufwies als die Suspension der Forellenerythrozyten, der intraretinale PO_2 deutlich geringer war.
12. Das Modell des isoliert perfundierten Auges ist zur physiologischen Untersuchung des choroidalen *Rete mirabile* und Sauerstoffkonzentrierung besser geeignet als *in vivo* – Experimente, da systemische Einflüsse vermieden und die Auswirkungen der Pseudobranchie auf die Blutchemie ausgeschaltet werden können.

2. Einleitung

Gefäßversorgung der Fischretina

Die Retina der Wirbeltiere ist eines der stoffwechselaktivsten Gewebe im Organismus (HOFFERT und FROMM, 1970) mit einem hohen Sauerstoffverbrauch (LINDEMANN, 1943; WITTENBERG und WITTENBERG, 1974; HOFER und GATUMU, 1994). Entsprechend dicht ist die Versorgung der Retina mit Blutgefäßen, die, je nach Tierart, bis an die äußere plexiforme Schicht der Retina vordringen. So konnte für die menschliche Retina eine maximale Diffusionstrecke zwischen Kapillaren und retinalen Zellen von ca. 140 µm nachgewiesen werden (MICHAELSON, 1954; DOLLERY *et al.*, 1969), ein Wert, der auch mit den bei anderen Säugern anzutreffenden Ausdehnung avaskulärer Retinabereiche übereinstimmt (CHASE, 1982).

Vielen Knochenfischen fehlt die bei den meisten Säugetieren vorhandene retinale Blutgefäßversorgung. Die Versorgung der Retina mit Nährstoffen und Sauerstoff (O₂) wird daher allein über das außerhalb des Pigmentepithels gelegene Kapillarnetz der Choroidea (Aderhaut) gewährleistet. Im Gegensatz zu den bei Säugern ebenfalls vorkommenden avaskulären Retinae, die eine Stärke von ca. 140 µm nicht überschreiten (CHASE, 1982), weist die Retina der Knochenfische eine wesentlich größere Dicke von bis zu 500 µm (NICOL, 1989) oder sogar darüber hinaus auf (WITTENBERG und WITTENBERG, 1974). Die Diffusionstrecken in der Retina der Knochenfische für O₂ und andere Nährstoffe sind somit um ein Mehrfaches größer als in der Säugerretina (WITTENBERG und WITTENBERG, 1974).

Wie von WITTENBERG und WITTENBERG (1961, 1962) erstmals beschrieben, ist der Sauerstoffpartialdruck (PO₂) im Bereich der Retina von Knochenfischen um ein Vielfaches über den Umgebungsdruck erhöht, wahrscheinlich um die durch den verlängerten Weg verminderte Diffusion von O₂ aus der Choroidea in die Retina zu kompensieren und eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Retina zu gewährleisten. Der Nachteil einer verlängerten Diffusionsstrecke Δx wird so durch Erhöhung der Partialdruckdifferenz ΔP zwischen den Gefäßen und dem Ort des Sauerstoffverbrauchs kompensiert (s. Formel 1).

$$J_{O_2} = {}^x D_{O_2} \cdot A \cdot \frac{\Delta P}{\Delta x}$$

Fick'sches Diffusionsgesetz

J_{O_2} : O₂-Flux / ${}^x D_{O_2}$: Diffusionskonstante für O₂ in Medium x / A: Austauschfläche / ΔP: Partialdruckdifferenz / Δx: Diffusionsstrecke (1)

Root-Effekt und *Rete mirabile*

An der Anhebung des PO₂ in den Kapillaren der Choroidea sind zwei Prozesse beteiligt:

Der **Root-Effekt** (KROGH und LEITCH, 1919; ROOT, 1931; ROOT und IRVING, 1943; Reviews s. BRITAIN, 1987; PELSTER und WEBER, 1991; PELSTER und RANDALL, 1998), der bis auf wenige Ausnahmen ausschließlich bei Hämoglobinen von Knochenfischen auftritt, wird für einen initialen Anstieg des PO₂ im Blut verantwortlich gemacht. Durch Ansäuerung des Blutes wird über eine Verminderung der Sauerstoffbindungskapazität des Hämoglobins selbst bei hohen PO₂ Sauerstoff aus seiner Bindung am Hämoglobin freigesetzt (SCHOLANDER und VAN DAM, 1954). Dadurch erhöht sich die Konzentration von physikalisch gelöstem O₂ im Blut, was direkt zu einer Erhöhung des lokalen Partialdrucks führt (Henry'sches Gasgesetz). Durch diese Erhöhung des Partialdrucks wird die Diffusion von O₂ aus dem Blut in umgebende Gewebe begünstigt. Das Auftreten des Root-Effekts bei Knochenfischen ist eng mit dem Vorliegen gassezernierender Strukturen in der Schwimmblase und im Auge korreliert (WITTENBERG und HAEDRICH, 1974; INGERMANN, 1982).

Dieser erste Schritt der Partialdruckerhöhung von O_2 , auch „*single concentrating effect*“ genannt, kann durch ein **Gegenstromsystem** vielfach verstärkt und zugleich auf einen eng begrenzten Gewebebereich beschränkt werden. Ein solches System besteht aus einer großen Zahl dicht gepackter, parallel verlaufender Kapillaren, wie ALBERS (1806) erstmals für das choroidale *Rete mirabile* zeigen konnte. JONES (1838) wies dann nach, dass auf der „Herz“-Seite des *Rete* das Blut aus der *Arteria ophthalmica* (= *A. ophthalmica*) in diesen choroidalen „Körper“ fließt und nach Passage des Gegenstromsystems auf der „Gewebe“-Seite des *Rete* die Choriokapillaren versorgt. Erst BARNETT (1951) erkannte aber, dass im choroidalen *Rete mirabile* jeweils arterielle und venöse Kapillaren eng benachbart angeordnet sind und dass das System durch den gegenläufigen Blutfluss in arteriellen und venösen Kapillaren als Gegenstromaustauscher funktionieren kann. Die Choriokapillaren bilden folglich Gefäßschleifen, die aus den arteriellen Kapillaren des choroidalen *Rete mirabile* hervorgehen und nach Verzweigung in ein dichtes Gefäßnetz in der Choroidea in die venösen Kapillaren des Gegenstromaustauschers übergehen (COPELAND, 1980). Der Bereich der Choriokapillaren wird als der Ort der initialen Partialdruckerhöhung des O_2 angesehen. Analoge Verhältnisse finden sich im Bereich des *Rete mirabile* und der Gasdrüse in der Schwimmblase von Fischen.

Bei der Schwimmblase bewirkt die Auslösung des Root-Effekts durch Ansäuerung des Blutes in den Gasdrüsenkapillaren einen Anstieg des PO_2 und erleichtert damit die Diffusion von O_2 in die Schwimmblase. In den sehr eng benachbarten Kapillaren des *Rete mirabile* der Schwimmblase des Aals diffundieren Kohlendioxid (CO_2), Milchsäure und O_2 dann vom venösen in den arteriellen Gefäßschenkel (STEEN, 1963; KOBAYASHI *et al.*, 1989a, 1990) und erhöhen dort den PO_2 schon bevor das Blut das Kapillarnetz der Gasdrüse erreicht und dort der PO_2 durch Ansäuerung weiter erhöht wird. Diese Rückdiffusion aus venösen in arterielle Kapillaren verstärkt so im Bereich des *Rete* die durch den Root-Effekt ausgelöste initiale Partialdruckerhöhung vielfach. Erhöhte PO_2 – Werte bleiben bei einem solchen System auf Gasdrüsenkapillaren und das *Rete mirabile* lokalisiert, da es am Ende des Netzes zum Angleich der Partialdrucke im arteriellen und venösen Blut des Gegenstromsystems kommt. Venöses Blut verlässt so das *Rete mirabile* mit annähernd arteriellem PO_2 .

Neben dem Root-Effekt zur Erhöhung des PO_2 im Blut kann der Gewebspartialdruck aller physikalisch gelösten Gase durch Aussalzung erhöht werden. Bildung von Milchsäure und Bikarbonat im Bereich gassezernierender Gewebe senkt die physikalische Löslichkeit von Gasen und führt damit zu einer allgemeinen Partialdruckerhöhung. Dieser Effekt ist als Mechanismus zur Füllung der Schwimmblase von Bedeutung (KUHN *et al.*, 1963), sein Beitrag zur Erhöhung des PO_2 im Auge ist unbekannt.

Von besonderer Bedeutung für die Konzentrierung des O_2 in der Schwimmblase und im Auge scheint das Enzym Carboanhydrase (CA) zu sein (FÄNGE, 1950, 1953; MAETZ, 1956; FAIRBANKS *et al.*, 1969, 1974; FONNER, *et al.*, 1973), ein Enzym, das in allen Geweben, die an einer Sauerstoffkonzentrierung beteiligt sind, in hohen Aktivitäten vorkommt (WITTENBERG und HAEDRICH, 1974). Eine Hemmung der CA vermindert oder unterdrückt vollständig die Gassekretion in der Schwimmblase (FÄNGE, 1953) und in der Retina (FAIRBANKS *et al.*, 1969, 1974).

Diese Prozesse sind an der Schwimmblase von Fischen im Detail untersucht (SCHOLANDER, 1954; STEEN, 1963; KOBAYASHI *et al.*, 1989a, b, 1990; PELSTER und SCHEID, 1992). Die ausgeprägte Ähnlichkeit zwischen den gassezernierenden Strukturen in Schwimmblase und Auge haben zu der Annahme geführt, dass sich auch die physiologischen Prozesse der Partialdruckerhöhung in diesen beiden Organen gleichen (FAIRBANKS *et al.*, 1969; WITTENBERG und WITTENBERG, 1974).

Pseudobranchie

Unterschiede zwischen Schwimmblase und Auge bestehen u.a. jedoch in der Anordnung vorgeschalteter vaskulärer Strukturen. Dem Kapillarsystem des Auges ist die sogenannte Pseudobranchie vorgeschaltet.

Dieser rudimentäre Kiemenbogen mit noch unbekannter Funktion (BRIDGES *et al.*, 1998) wird bei der Regenbogenforelle mit oxygeniertem Blut aus dem ventralen Ausgang der efferenten Kiemenarterie des ersten Kiemenbogens versorgt. Innerhalb der Pseudobranchie verzweigt sich dieses Gefäß in ein feines Kapillarsystem und vereint sich wieder zur Augenarterie, der *A. ophthalmica*, die die einzige Blutversorgung des choroidalen *Rete mirabile* bildet (JONES, 1838; MÜLLER, 1839; COPELAND, 1980). Schon früh (MÜLLER, 1839) wurde daher ein enger Zusammenhang zwischen der Pseudobranchie und dem Sehprozess der visuellen Wahrnehmung der Knochenfische vermutet (s. auch LEINER, 1938; WITTENBERG und HAEDRICH, 1974). Neben Theorien zur Funktion der Pseudobranchie als Baro- oder Chemorezeptor oder als Drüse (LAURENT und DUNEL-ERB, 1984), wird rezent wieder eine Funktion der Pseudobranchie im Zusammenhang mit Prozessen des Auges diskutiert. Neuere Messungen unterstützen die Hypothese von WITTENBERG und HAEDRICH (1974), dass die Pseudobranchie das zum Auge und in das choroidale *Rete mirabile* fließende Blut in einer Weise konditioniert, die die Anhebung des PO_2 im Auge unterstützt bzw. vorbereitet (BERENBRINK, 1995; MÜLLER, 1995; BRIDGES *et al.*, 1998).

Soweit bekannt, beruht der Prozess der Partialdruckerhöhung von O_2 also auf Veränderungen der physikalisch-chemischen Zusammensetzung des Blutes: Im Bereich der „Gasdrüse“ wird durch Stoffwechselprodukte das Blut angesäuert und direkt eine Partialdruckerhöhung ausgelöst und im Bereich des Gegenstromaustauschers wird durch Rückdiffusion verschiedener Stoffe aus venösen in arterielle Kapillaren das Blut für die endgültige Freisetzung von O_2 im Bereich der Gasdrüse konditioniert. Für die Gassekretion im Auge mag eine Vor-Konditionierung des Blutes teilweise bereits in der Pseudobranchie stattfinden.

Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Studie ist es, Basis zur Differenzierung einzelner Faktoren bei der Sauerstoffkonzentrierung im Auge von Knochenfischen zu legen. Im Gegensatz zu den Vorgängen in der Schwimmblase fehlen detaillierte Untersuchungen zu den Mechanismen der Sauerstoffkonzentrierung im Auge. Daten über die dafür notwendigen Komponenten und Parameter liegen praktisch nicht vor.

Zunächst wurde ein für die Experimente geeignetes Versuchstier ausgewählt. Dieses musste die notwendigen anatomischen und physiologischen Voraussetzungen aufweisen und in ausreichender Zahl und insbesondere in für die chirurgischen Eingriffe ausreichender Größe verfügbar sein. Die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) erfüllte diese Bedingungen, da sie unabhängig von der Jahreszeit kommerziell erhältlich ist und auch bei hinreichender Körpergröße in größeren Stückzahlen problemlos über längere Zeiträume gehalten werden kann.

Vorbereitend für die geplanten *in vivo*- und *in vitro*-Versuche wurde die anatomische/physiologische Eignung der Regenbogenforelle für die Experimente überprüft. Dazu wurde durch Kunststoffausgüsse das Gefäßsystem der Forelle dargestellt und der Aufbau der Retina mikroskopisch untersucht.

Für die geplanten Messungen musste des weiteren eine Versuchs-Routine etabliert werden, die bei kontinuierlicher Überwachung des Zustandes der Versuchstiere Langzeitmessungen an betäubten, künstlich ventilierten Forellen gestattete. Ziel war es, die Forellen trotz der für die Experimente notwendigen Langzeitnarkose und künstlichen Beatmung in einer Kondition zu erhalten, die dem natürlichen Zustand freischwimmender Forellen möglichst nahe kam. Dafür notwendige Messsysteme mussten eingerichtet und eine computergestützte Datenerfassung entworfen und programmiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit mussten zusätzlich die für die intraretinale Sauerstoffpartialdruckmessungen benötigten Mikroelektroden entwickelt und in ausreichender Menge für die Experimente hergestellt werden.

In einem ersten *in vivo* – Versuchsabschnitt wurde an betäubten, künstlich ventilierten Forellen der normale intraretinale PO_2 gemessen sowie die normale Funktion der Retina während der Sauerstoffmessung durch Ableitung des Elektoretinogramms überprüft.

Vor Durchführung der *in vitro* – Experimente wurden Rahmenfaktoren wie die Durchblutungsrate des Auges am lebenden Tier abgeklärt. Schließlich wurden Auswirkungen der Manipulationen zur intraretinalen Sauerstoffmessung auf den Augeninnendruck überprüft, bevor mit der Entwicklung eines isolierten Augenmodells der Forelle begonnen werden konnte.

Für weitergehende Untersuchungen des Mechanismus der Sauerstoffkonzentrierung im Auge ist die Kontrolle und gezielte Einstellung einzelner Parameter des in das Auge hinein fließenden Blutes und die gleichzeitige Erfassung ihrer Auswirkungen auf den intraretinalen PO_2 notwendig. Bei Knochenfischen ist der Blutversorgung des choroidalen *Rete mirabile* jedoch die Pseudobranchie vorgeschaltet. Eine gezielte Beeinflussung und Kontrolle von Blutparametern im Auge, die bei Versuchen am Gesamtorganismus über die Ventilation des Versuchstieres erfolgen müsste, ist daher bei *in vivo* – Versuchen kaum möglich. Um dieses Problem zu umgehen musste ein methodischer Ansatz zur Untersuchung der Sauerstoffsezernierung an isoliert perfundierten Forellenaugen entwickelt werden. Mit dieser Methode sollten erste Daten zum Prozess der retinalen Sauerstoffversorgung gewonnen und eine Grundlage für die Durchführung weiterer Untersuchungen zu diesem Thema geschaffen werden.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere¹

Als Versuchstiere wurden Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) beiderlei Geschlechts mit einer Länge von durchschnittlich 32 cm (S.D. = 4,3 cm, n = 141) und einem mittleren Gewicht von 381 g (S.D. = 112 g, n = 206) verwandt. Speziell für die Versuche gezüchtete Forellen wurden vom Umweltbundesamt, Zweigstelle Marienfelde, bezogen, andere wurden von lokalen Händlern beschafft. Am Lehrstuhl wurden die Fische bis zu den Versuchen in großen Glasaquarien (Volumen ca. 1,8 m³, maximal 40 Fische m⁻³) bei einer Temperatur von 12 – 17°C und einem Lichtregime von 11 h dunkel / 11 h hell mit jeweils 1 h Dämmerungsübergang, gehalten. Das Wasser in den Aquarien wurde durch angeschlossene Filter mit ca. 60 l min⁻¹ permanent umgewälzt und wöchentlich auf Nitritbelastung überprüft. Zusätzlich wurden in die Aquarien 10 l h⁻¹ Frischwasser eingeleitet. Die Forellen wurden wochentags mit 0,25 bis 1% des Körpergewichts Forellenfutter ernährt.

3.2 Anatomische Untersuchungen

3.2.1 Gefäßausgänge im Bereich der Pseudobranchie und des Auges

Um den Verlauf der Gefäße, die das Auge versorgen, von den Kiemen bis zum Auge zu verfolgen, wurden arterielle Ausgänge des Gefäßsystems von ganzen Forellen hergestellt. Neben der Darstellung der Gefäßtopologie diente diese Präparation auch der Auswahl einer geeigneten Stelle für die Durchblutungsmessung des Auges.

Vor Beginn der Präparation wurde das Perfusionssystem, bestehend aus einem Katheter (PE90-Schlauch, G1, S. 96), einem angeschlossenen 3-Wege-Hahn und zwei daran angeschlossenen 10 ml – Einwegspritzen luftblasenfrei mit Heparin- und Na-Nitroprussid-haltiger Forellen-Ringerlösung (C11, S. 96) gefüllt.

Eine Forelle wurde mit einer Überdosis Betäubungsmittel von 5 g l⁻¹ MS222 getötet und in einer Wanne, die betäubungsmittelhaltiges Wasser enthielt (C4, S. 95), auf dem Rücken liegend fixiert. Durch einen Median-schnitt cranial der Bauchflossen wurde das Herz freigelegt. Der Ventrikel wurde eröffnet, der Katheter durch den Ventrikel bis in den *Truncus arteriosus* vorgeschoben und durch eine Ligatur fixiert. Für freien Durchlauf der Perfusate durch das Gefäßsystem wurde der *Sinus venosus* zum Ablauf der Perfusate eröffnet.

Das Gefäßsystem der Forelle wurde anschließend mit zwei verschiedenen Forellen-Ringerlösungen gespült. Zuerst wurde mit 20 ml Heparin- und Na-Nitroprussid-haltiger Forellen-Ringerlösung (C11, S. 96) perfundiert. Das in der Lösung enthaltene Na-Nitroprussid setzt Stickstoffoxid frei, das eine Gefäßdilatation bewirkt. Anschließend wurde das Gefäßsystem mit 20 ml Glutaraldehyd-haltiger Forellen-Ringerlösung (C12, S. 96) gespült, wobei das Glutaraldehyd der Fixierung der Gefäßwände dient.

10 ml des Injektionskunststoffes (G2, S. 96) wurden unmittelbar vor der Verwendung mit einer entsprechenden Menge Katalysator angemischt und dann mit einer an den 3-Wege-Hahn angeschlossenen Einmal-Spritze in das Gefäßsystem injiziert. Zur Aushärtung des Kunststoffs wurden die Forellen entweder bei 60°C für 1 h in einen Trockenschrank (G3, S. 96) oder für 1 h in warmes Wasser von ca. 40°C gelegt. An-

¹ Alle Tierversuche wurde im Rahmen des unter G294/96 genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt. Tiertötungen zur Organentnahme waren unter T0038/98 angezeigt.

schließlich wurden die Forellen bis zur Präparation, die innerhalb von 10 Tagen erfolgte, bei -20°C eingefroren.

Zur Verfolgung des Gefäßverlaufs von den Kiemen über die Pseudobranchie bis zum Auge wurden zwei Forellen präpariert, bei zwei anderen wurde das Körpergewebe durch Eintauchen der ausgegossenen Forelle in KOH-Lösung aufgelöst, so dass ausschließlich die Kunststofffüllung der Gefäße erhalten blieb und untersucht werden konnte.

3.2.2 Darstellung der Retina von Regenbogenforellen

Drei Forellen wurden durch einen Schlag auf den Kopf und Ausbluten getötet. Von beiden Augen wurde jeweils die Cornea entlang des Limbus abgetrennt und die Linse entfernt. Die exstirpierten Augen wurden dann für mehrere Tage bei 4°C in Fixierlösung (2,5% Glutaraldehyd in Forellen-Ringerlösung, C6, S. 95) eingelegt. Anschließend wurden die Augen in 80%iges Äthanol überführt, das nach jeweils mehreren Tagen zweimal gegen frische Lösung ausgetauscht wurde.

Nach Einbettung in Paraffin wurden die Augen erst durch einen sagittalen Transversalschnitt halbiert. Der Schnittwinkel (dorso-ventral bis naso-temporal) war von Auge zu Auge unterschiedlich, so dass alle Bereiche der Retina in die Messung der Dicke der einzelnen Schichten eingingen. Von den Schnittflächen jeder Augenhälfte wurden dann einige Schnitte mit einer Stärke von 6 µm angefertigt. Diese Schnittführung gewährleistete senkrechte Schnitte der Retina.

Ausgehend von der Bruch'schen Membran wurden anschließend über den gesamten Bereich der Retina die Stärken der einzelnen Schichten gemessen. Von den insgesamt sechs Augen der drei Forellen wurden jeweils mehrere Schnitte ausgewertet. Erst wurde für jede Forelle separat der Mittelwert der einzelnen Schichtdicken bestimmt und anschließend für die drei Forellen der Mittelwert und Standardfehler der Schichtdicken berechnet. Zur Bestimmung der Gesamtstärke der Retina wurden die Mittelwerte der einzelnen Schichtdicken addiert. Der Standardfehler der Gesamtstärke wurde durch Fehlerfortpflanzung aus den Standardfehlern der einzelnen Schichtdicken berechnet.

Die Anfertigung von Semidünnschnitten sowie die Messungen der Retina wurde im Rahmen eines Personenaustausches (DAAD 03018013) mit freundlicher Unterstützung von Riita Suoranta und Dr. Heikki Tuurala an der Helsinki University durchgeführt.

3.3 Experimente *in vivo*

An lebenden, vollnarkotisierten Forellen wurden folgende Versuchsserien durchgeführt: die Messung des Blutflusses in der afferenten Pseudobranchienarterie (s. 3.3.2.2, S. 22), des Augeninnendrucks während der Präparation für die intraretinale PO_2 – Messung (s. 3.3.2.3, S. 26), sowie die Ableitung des intraretinalen PO_2 (s. 3.3.2.4, S. 27) und der Elektroretinogramme (s. 3.3.2.5, S. 28).

Diese Messungen zielten darauf ab, normale *in vivo* – Werte einzelner Parameter zu etablieren. Es wurde großer Wert darauf gelegt, trotz chirurgischer Eingriffe und erforderlicher Langzeitnarkose und Relaxation, den Allgemeinzustand der Tiere während der Versuche so aufrecht zu erhalten, dass homöostatische Parameter normaler, freischwimmender Forellen erreicht wurden.

Die Fische wurden bei allen, auch kurzzeitigen Eingriffen künstlich ventiliert (s. 3.3.1, S. 19). Vor der Durchführung des eigentlichen Versuches wurde den Forellen ein Katheter in die dorsale Aorta implantiert (s. 3.3.2.1, S. 20), durch den vor Beginn des Versuchs eine Blutprobe zur Kontrolle des arteriellen PO_2 und pH-Wertes entnommen wurde und über den während des Experiments Blutdruck, Herzschlagamplitude und

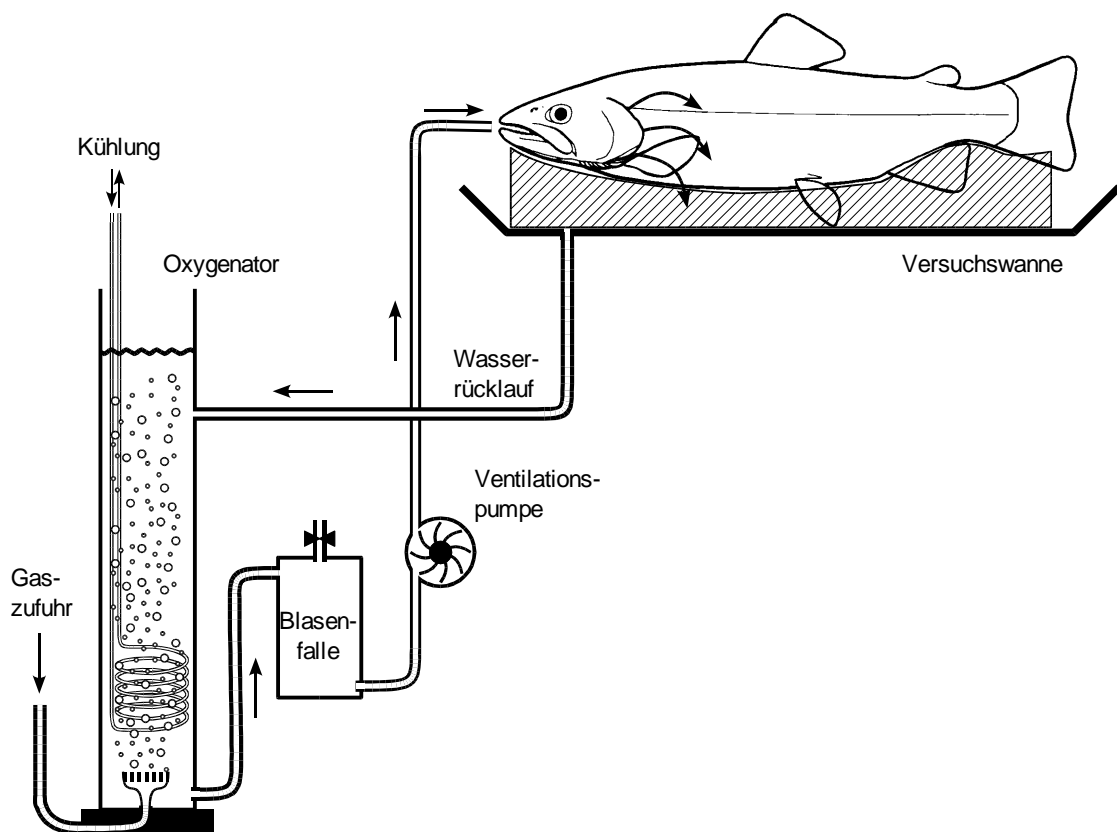
-frequenz kontinuierlich überwacht wurden. Auch während des Experiments wurden durch den Katheter Blutproben aus der dorsalen Aorta entnommen und pH-Wert (s. 3.5, S. 34) und PO_2 (s. 3.5, S. 36) des arteriellen Blutes kontrolliert.

Nach Beendigung der Versuche wurden die Tiere in Narkose durch Sektion der Halswirbelsäule und Ausbluten getötet.

3.3.1 Künstliche Ventilation

Die für die Versuche vorgesehenen Forellen wurden in einem temperaturisolierten Behälter mit 5 l betäubungsmittelhaltigem (C3, S. 95), über eine Luftpumpe und einen Sprudelstein belüftetem Wasser von den Tierhaltungsräumen ins Labor transportiert. Dort wurden die Forellen für die Zeitdauer des chirurgischen Eingriffs bzw. des Experiments auf einem Körperformbett (Fischhalter) in eine Versuchswanne gelegt und unter Aufrechterhaltung der Narkose (C4, S. 95) künstlich ventiliert (s. Zeichnung 1).

Das Ventilationssystem (nach HEISLER, 1978, verändert) bestand aus einem Plexiglaszylinder mit einer Höhe von ca. 1 m und einen Durchmesser von ca. 10 cm, der mit 6,5 - 8 l Leitungswasser befüllt wurde (s. Zeichnung 1 „Oxygenator“). Kurz über dem Boden des Oxygenators befand sich eine Fritte, durch die zur Äquilibration des Ventilationswassers Luft oder ein Gasgemisch mit einer Volumenrate von 10 l min^{-1} gepumpt



Zeichnung 1: Schema der künstlichen Ventilation der Forellen.

Im Oxygenator wurde das Ventilationswasser mit Gas äquilibriert und auf 15°C thermostatisiert. Von dort wurde es durch eine Blasen-falle mit einer Aquarienpumpe zur Versuchswanne hochgepumpt und über ein Beatmungsstück dem Versuchstier über die Kiemen geleitet. Von der Versuchswanne floss das Wasser zurück zum Oxygenator.

wurde (G4, S. 96). Das Ventilationswasser wurde über Kühlwendel, die an einen Umlaufkühler (G5, S. 96) angeschlossen waren, auf eine Temperatur von $15 \pm 0,1^\circ\text{C}$ thermostatisiert.

Mit einer Aquariumpumpe (G6, S. 96) wurde das Ventilationswasser aus dem Oxygenator durch eine Blasenfalle angesaugt, zur Versuchswanne hochgepumpt und durch ein Mundstück der Forelle über die Kiemen geleitet. Von dort floss das Ventilationswasser wieder zurück in den Oxygenator. Die Pumprate der Aquariumpumpe betrug maximal 4 l min^{-1} . Durch einen Bypass mit Absperrventil, der von der Ventilationspumpe direkt zurück zum Oxygenator führte (in Zeichnung 1, S. 19 nicht eingezeichnet), konnte die Wassermenge, die zur Ventilation der Forellen zur Versuchswanne gepumpt wurde, reguliert werden.

Die Effektivität der künstlichen Ventilation wurde anhand des PO_2 und des pH-Wertes im arteriellen Blut überprüft. Es stellte sich heraus, dass durch die Ventilation der PO_2 ausreichend hoch war, jedoch ein deutlicher Anstieg des arteriellen pH-Wertes im Vergleich zu Kontrollmessungen an unbetäubten Tieren auftrat. Als Ursache für diese Auswirkung der künstlichen Ventilation wurde eine durch Hyperventilation verursachte Hypocapnie und dadurch ausgelöste respiratorische Alkalose bei den Forellen vermutet. Die Pumprate der Ventilationspumpe von max. 4 l min^{-1} (ca. $10\text{ l min}^{-1}\text{ kg}^{-1}$) war um ein Vielfaches höher als die normale Ventilation einer spontan ventilierenden Forelle von ca. $200\text{ ml min}^{-1}\text{ kg}^{-1}$ (JANSSEN und RANDALL, 1975) bzw. $360\text{ ml min}^{-1}\text{ kg}^{-1}$ (PLAYLE *et al.*, 1990). PERRY *et al.* (1996) geben allerdings eine normale Ventilationsrate von $1,22\text{ l min}^{-1}\text{ kg}^{-1}$, GILMOUR und PERRY (1996) eine Rate von $945\text{ ml min}^{-1}\text{ kg}^{-1}$ an. Ein großer Anteil des Wassers stand bei der künstlichen Ventilation für den Gasaustausch aber nicht zur Verfügung, da das Wasser teilweise an den Kiemen vorbei strömte und auch wieder aus dem Maul austrat. Die hohe Ventilationsrate gewährleistete jedoch eine vollständige Sauerstoffsättigung des Blutes, führte gleichzeitig aber zu der Hypocapnie. Da eine Veränderung der Ventilationsrate auch eine Änderung des PO_2 zur Folge hatte (s. auch DAVIS und CAMERON, 1971), wurde durchgehend eine hohe Ventilationsrate eingestellt und es wurde dem Oxygenator zur Kompensation der Hypocapnie Luft mit einem erhöhten CO_2 -Gehalt von ca. 0,30% zugeleitet (G7 u. G8, S. 96). Der arterielle pH-Wert wurde während des Versuchs zusätzlich ständig kontrolliert, so dass der CO_2 -Gehalt entsprechend auftretenden pH-Änderungen angepasst werden konnte.

3.3.2 Chirurgische Präparationen

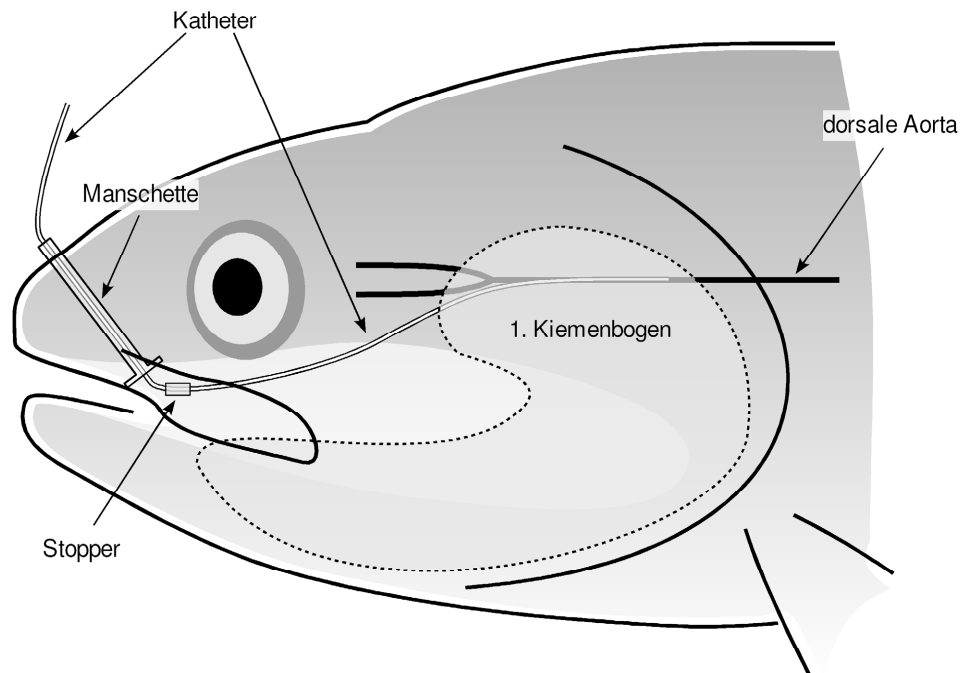
3.3.2.1 Katheterisierung der dorsalen Aorta

Die Katheterisierung der dorsalen Aorta (DA) wurde in Anlehnung an die Methode von SOINVIO *et al.* (1975) durchgeführt. Ein PE60-Schlauch (G1, S. 96) wurde über einer Flamme erhitzt und zu einer feinen Spitze ausgezogen. Ein konisch angespitzter Mandrin (federharter Edelstahldraht, Durchmesser 0,68 mm) wurde in den Katheter eingeschoben. Die Verjüngung des Schlauches wurde so mit einem Skalpell abgeschnitten, dass der Mandrin durch die Öffnung durchgeschoben werden konnte, der Schlauch aber eng um den Mandrin abschloss. Anschließend wurden 1 und 1,5 cm hinter der Spitze des Schlauches auf gegenüberliegenden Seiten zwei seitliche Öffnungen in den Katheter geschnitten. Als Längenmarkierung und Stopper gegen Herausziehen des Katheters wurde 7 cm hinter der Spitze des Schlauches ein kurzes Stück eines längs aufgeschnittenen PE100-Schlauches (G1, S. 96) auf den Katheter geklebt (G9, S. 96).

Vor der Insertion wurde der Katheter mit heparinisierter Forellen-Ringerlösung (C8, S. 95) gefüllt. Der Mandrin wurde eingeschoben, bis die konische Spitze aus dem Katheter knapp herausragte. Um während der Insertion ein Verschieben des Schlauches auf dem Mandrin zu verhindern, wurde der Katheter mit einer Arterienklemme mit auf das Maul aufgeschobenen Silikon-Schlauchstücken auf dem Mandrin fixiert.

Die zu katheterisierende Forelle wurde aufrecht auf den Fischhalter gelegt und unter Aufrechterhaltung der Narkose (C4, S. 95) künstlich ventiliert.

Zunächst wurde mit einem 2,3 mm – Spiralbohrer eine Öffnung durch den Oberkiefer in die Mundhöhle gebohrt (G10, S. 96), durch die später der Katheter aus dem Maul herausgeführt wurde. Die Forelle wurde anschließend auf den Rücken gedreht und durch die Öffnung im Oberkiefer wurde eine Manschette eingesetzt. Diese bestand aus einem Stück PE200-Schlauch (G1, S. 96), das an einem Ende zu einem Flansch verformt war, damit die Manschette nicht nach außen aus der Öffnung im Oberkiefer herausgezogen werden konnte (s. Zeichnung 2).



Zeichnung 2: Schematische Darstellung der Katheterisierung der dorsalen Aorta.

Vor der Katheterisierung der dorsalen Aorta wurde der Oberkiefer durchbohrt und in die Öffnung wurde eine Manschette eingesetzt. Der Katheter wurde dann in die dorsale Aorta eingestochen und durch die Manschette nach außen geführt. Ein auf den Katheter aufgeklebtes Schlauchstück diente als Stopper, der das Herausziehen des Katheters verhinderte.

Zur Insertion des Katheters wurde der Beatmungsschlauch aus dem Maul der Forelle entfernt. Über zwei kleinere Schläuche, die unter die Kiemendeckel gesteckt wurden, wurde stattdessen Ventilationswasser retrograd über die Kiemen geleitet. Der Katheter wurde im Munddach zwischen dem ersten und zweiten Kiemenbogen mit einem Winkel von ca. 30° eingestochen und 0,5 – 1 cm bis in die DA vorgeschoben. Dann wurde die Arterienklemme entfernt und der Katheterschlauch wurde alleine weiter vorgeschoben, während der Mandrin langsam herausgezogen wurde. Der Katheter wurde mit der Arterienklemme verschlossen und der Mandrin ganz entfernt. Beim Öffnen der Arterienklemme stieg in der Regel das Blut durch den Blutdruck im Katheter an.

Zum Abschluss wurde der Katheter mit Forellen-Ringerlösung (C6, S. 95) von Blut freigespült, mit heparinierter Forellen-Ringerlösung (C8, S. 95) gefüllt, mit einem Stahlstift verschlossen und durch die Manschette im Oberkiefer nach außen geführt (s. Zeichnung 2).

Damit sich die Tiere vom Stress der Katheterisierung erholen und dadurch eventuell aufgetretene Änderungen von Blutparametern vor dem eigentlichen Versuch abklingen konnten, wurden die Forellen nach der

Katheterisierung im Labor über Nacht in einem abgedunkelten Becken mit einem Volumen von ca. 90 l und einer Temperatur von 15°C gehalten. In das Becken wurde durch einen Sprudler Luft eingeblasen und das Wasser wurde mit einer Aquarienpumpe durch einen Filter umgewälzt. Die Forellen wurden im Becken einzeln in opaken Röhren gehalten, die vorne und hinten mit einem Gitter verschlossen waren und an der Oberseite einen Spalt aufwiesen, durch den der Katheter zugänglich war, ohne dass die Tiere gestört werden mussten.

Um die Forellen am nächsten Tag ohne erneuten Stress durch Einfangen für den Versuch verwenden zu können, wurde jeweils eine Forelle in der Röhre mit ca. 5 l Wasser mit einer passenden Wanne aus dem Becken herausgenommen und es wurde eine Blutprobe durch den Katheter entnommen. Der Plasma pH-Wert und der PO_2 des Blutes wurden gemessen (s. 3.5, S. 34 und 3.5, S. 36). Dazu wurde eine 1 ml-Einwegspritze an den Katheter angeschlossen und ca. 400 µl Blut entnommen. Aus der Spritze wurden dann eine Probe in die pH-Elektrode eingesaugt, eine weitere Probe in die Messkammer für die Bestimmung des PO_2 injiziert. Diese vor der Betäubung und künstlichen Ventilation der Versuchstiere bestimmten Werte wurden als Referenzwerte des ungestörten und ausgeruhten Tieres betrachtet. Anschließend wurden zu den 5 l Wasser in der Wanne Betäubungsmittel (C5, S. 95) zugegeben und die Forelle wurde nach Eintreten der Betäubung auf den Fischhalter in die Versuchswanne gelegt und künstlich ventiliert.

Während der Versuche war an den Katheter ein Drucksensor (G11, S. 96) zur kontinuierlichen Messung von Blutdruck und Herzschlag angeschlossen. Die Messung dieser Parameter wurde im Versuchsverlauf wiederholt kurz unterbrochen, um durch den Katheter Blutproben zur Überprüfung des arteriellen pH-Wertes und des PO_2 entnehmen zu können.

3.3.2.2 Blutflussmessung in der afferenten Arterie der Pseudobranchie

Zur Bestimmung der Durchblutungsrate des Auges wurde der Blutfluss in der afferenten Arterie der Pseudobranchie (aPA) gemessen.

Wie in der Einleitung beschrieben, stellt das efferente Pseudobranchiengefäß (= *A. ophthalmica*) die einzige Blutversorgung des choroidalen *Rete mirabile* dar. Dieses Blutgefäß verlässt die Pseudobranchie an ihrem zur Körpermitte gelegenen Pol, ist oberhalb des Parasphenoid-Knochen durch eine kurze und dünne Anastomose mit dem gleichen Gefäß der anderen Körperseite verbunden und tritt dann von ventral-temporal in die Augenhöhle ein. Dort verläuft das Gefäß bis zum Sehnerv dorsal und dann an diesem entlang bis in den Augapfel. Der gesamte Gefäßverlauf von der Pseudobranchie bis zum Auge ist daher für eine Blutflussmessung nur sehr schwer zugänglich (s. auch Zeichnung 4, S. 24 „*A. ophthalmica*“, Abbildung 7, S. 47 „efferente Pseudobranchienarterie“ und Abbildung 8, S. 48 „*A. ophthalmica*“).

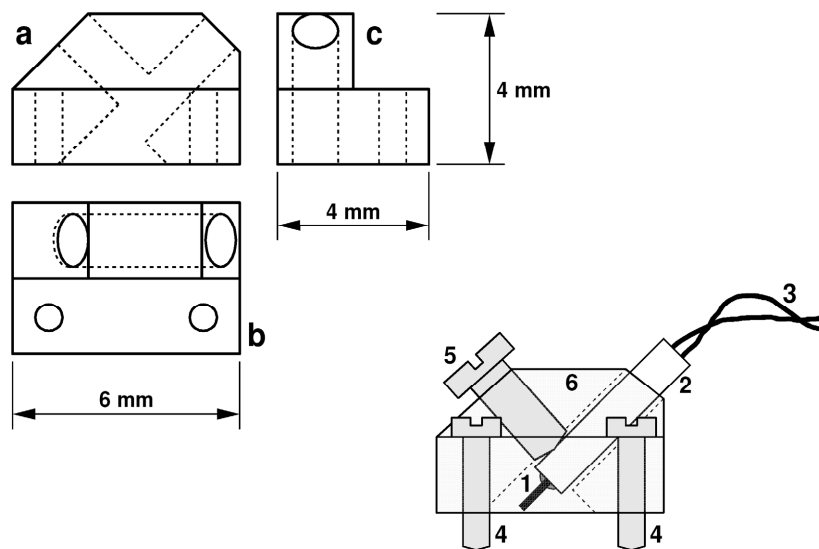
Die aPA war hingegen für eine Flussmessung präparatorisch leichter zu erreichen. Dieses Gefäß, das gleichzeitig die ventrale efferente Arterie des ersten Kiemenbogens ist (s. Einleitung), durchdringt an der ventralen Spitze des Kiemenbogens den Basohyal, den vordersten Knochen des Hyalbogens und verläuft dann, lediglich in eine Furche eingesenkt, auf der Oberfläche der zwei folgenden Hyalknochen Ceratohyal und Epihyal Richtung caudal (s. Zeichnung 4, S. 24 und Abbildung 7, S. 47 „afferente Pseudobranchienarterie“). Im anterioren Bereich des Ceratohyal ist die aPA von Unterkiefermuskeln und Epidermis bedeckt, während sie im posterioren Bereich des Ceratohyal und im Bereich des Epihyal nur von einer dünnen Epidermis bedeckt und hier durch Abspreizen des Maxillarbogens ohne Präparation schon sichtbar ist. Die Lage des Gefäßes in der Knochenrinne hatte für die Flussmessung den Vorteil, dass das Gefäß nicht vollständig freipräpariert werden musste und dass der Messsensor auf dem Knochen fixiert werden konnte.

Es wurde der normale Fluss in der aPA sowie die Änderung des Flusses in der aPA bei Verschluss des kontralateralen Gefäßes gemessen.

Zur Bestimmung des Blutflusses in der aPA wurde ein Ultraschall-Doppler-System eingesetzt. Dazu wurde ein Piezokristall (G13, S. 96) mit einem Durchmesser von 1 mm mit einem Directional Pulsed Doppler Flowmeter (G14, S. 97) verwandt.

Halterung für den Dopplerkristall

Um den Dopplerkristall ohne Beeinträchtigung der aPA anbringen zu können, wurde eine spezielle Halterung angefertigt (s. Zeichnung 3). Diese bestand aus einem kleinen Plexiglasblock, der auf einer Seite zwei Bohrungen für Miniatur-Knochenschrauben (G15, S. 97) aufwies, mit denen der Block auf dem Ceratohyal (s. Zeichnung 4, S. 24) festgeschraubt werden konnten. Auf der anderen Seite befand sich eine in einem Winkel von 45° angebrachte Bohrung für die Aufnahme des Dopplerkristalls. Eine Schraube diente zur zusätzlichen Arretierung und Fixierung des Kristalls in der Halterung.



Zeichnung 3: Halterung für den Dopplerkristall zur Blutflussmessung in der afferenten Arterie der Pseudobranchie.

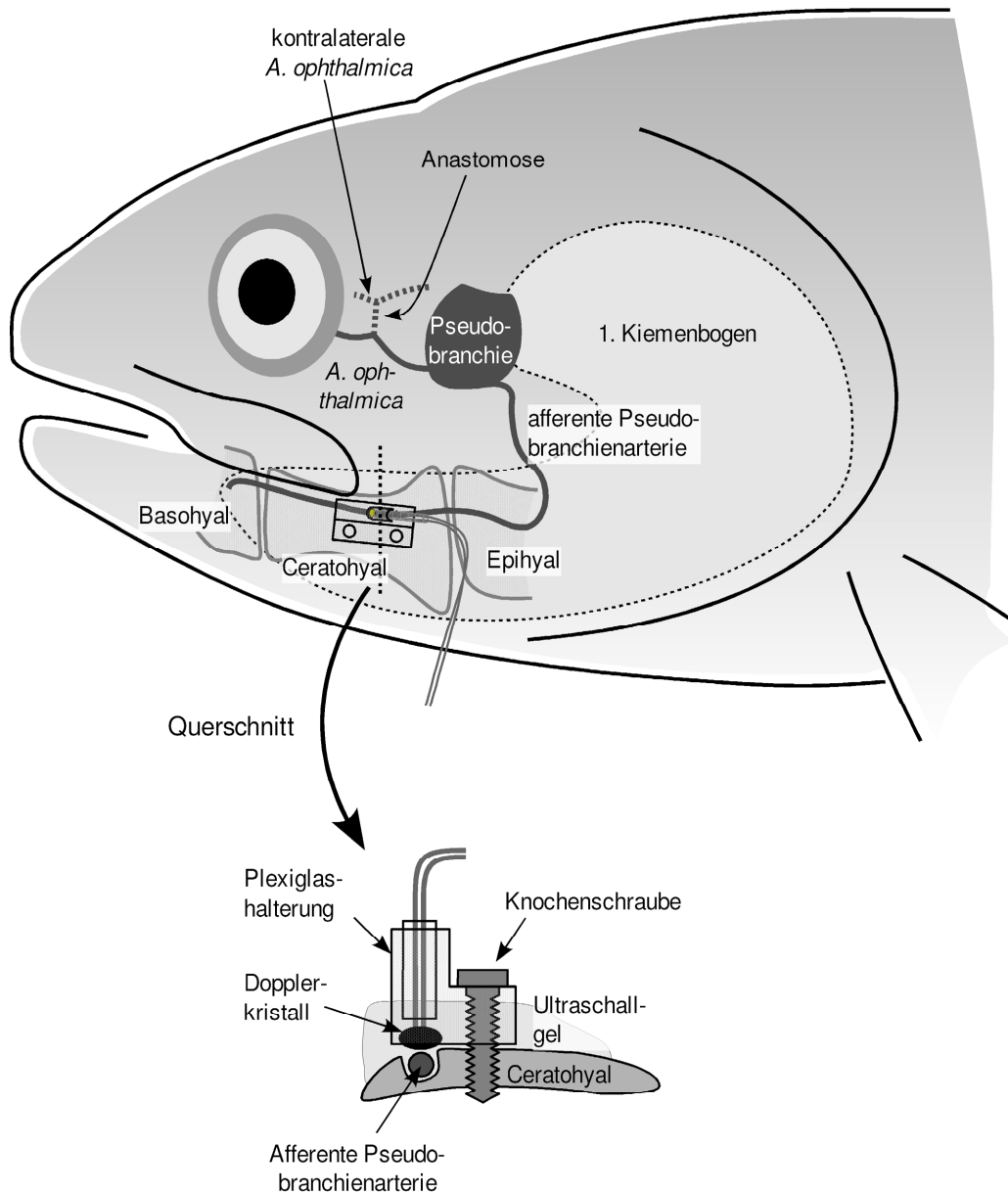
a – c) Seiten-, Auf- und Frontansicht der Plexiglashalterung. 1) Dopplerkristall, 2) PE-Schlauchstück, 3) Anschlusskabel des Kristalls, 4) Knochenschrauben, 5) Arretierungsschraube, 6) Plexiglashalterung.

Der Doppler-Kristall war zur einfacheren Handhabung und Justiermöglichkeit mit den Anschlusskabeln in ein Stück PE60-Schlauch (G1, S. 96) so eingeklebt, dass der Kristall selber vorn aus dem Schlauchstück herausragte. Mit dem PE-Schlauch wurde der Kristall in die 45° -Bohrung des Plexiglasblocks eingeschoben und nach erfolgter Justierung mit der Arretierungsschraube fixiert.

Präparation zur Messung des Flusses

Eine katheterisierte Forelle wurde seitlich auf den Fischhalter gelegt und künstlich ventiliert. Der Maxillarbogen der kontralateralen Seite wurde abgespreizt, die aPA wurde im Bereich des Epihyal freigelegt und es wurde ein Faden für den späteren Verschluss um das Gefäß geschlungen. Die Forelle wurde dann auf die andere Seite gedreht und der Maxillarbogen wurde mit einem Haken abgespreizt, so dass der darunter liegende Hyalbogen für die Präparation zugänglich war. Durch Entfernen von Haut und Unterkiefermuskeln wurde die in einer Furche der Hyalknochen liegende aPA im Bereich von Baso-, Cerato- und Epihyal freigelegt. Das Gefäß selber wurde dabei nicht berührt und blieb noch von weiteren Häuten bedeckt. Nur an den beiden äußeren Enden des freilegt Gefäßbereiches, an dem Baso- und Epihyal, wurde die aPA auf jeweils einem

kurzem Abschnitt vollständig vom umgebenden Gewebe befreit und es wurden jeweils zwei Ligaturen um das Gefäß vorbereitet. Dazu wurden chirurgische Fäden um das Gefäß geschlungen. Im mittleren Bereich auf dem Ceratohyal blieb das Gefäß für die Flussmessung ungestört.



Zeichnung 4: Schematische Darstellung der Position des Dopplerkristalls auf dem Ceratohyal zur Blutflussmessung in der afferenten Arterie der Pseudobranchie.

Die aPA wurde auf dem Ceratohyal freigelegt. Der Dopplerkristall wurde dann, fixiert in der Halterung, für die Flussmessung durch Knochenschrauben auf dem Ceratohyal befestigt.

Auf die Stelle, an der der Kristall angebracht werden sollte, wurde etwas Ultraschallgel gegeben. Der Plexiglasblock mit Doppler-Kristall wurde auf den Knochen gehalten und justiert, bis ein optimales Signal erhalten wurde. Durch die Bohrungen für die Knochenschrauben in der Plexiglashalterung wurden dann Löcher in den Ceratohyal gebohrt und die Halterung wurde mit den Schrauben auf dem Ceratohyal fixiert (s. Zeichnung 4, S. 24). Nach der Messung eines konstanten Flusssignals wurde mit der vorbereiteten Fadenschlinge

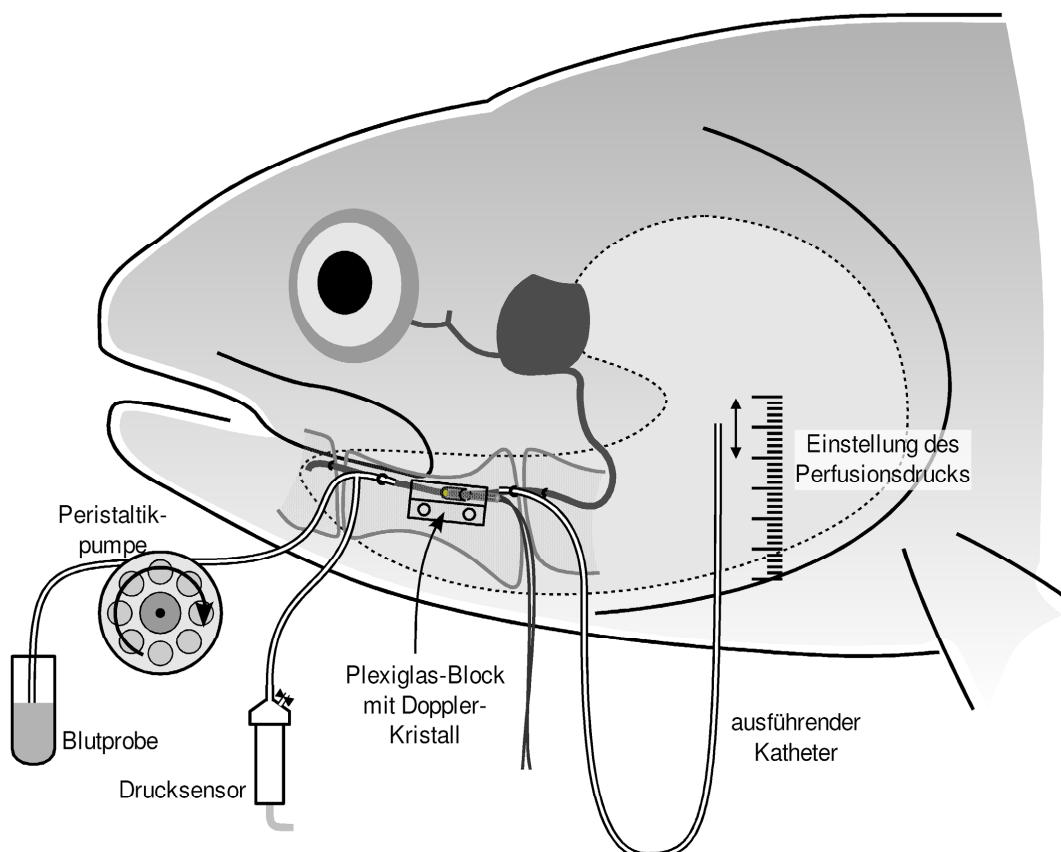
das kontralaterale Gefäß mehrmals hintereinander kurz verschlossen und wieder geöffnet und die Änderung des Flusses im ipsilateralen Gefäß wurde aufgezeichnet.

Zur computergestützten Datenerfassung des Flusssignals s. 3.7, S. 42.

Präparation für die Eichung des Flusssignals

Das Flusssignal wurde nach der Messung *in situ* geeicht (s. auch AXELSSON und FRITSCHKE, 1991). Dazu wurde die aPA katheterisiert und es wurde Blut mit bekannter Volumenrate durch die unter dem Dopplerkristall liegende aPA hindurchgepumpt (s. Zeichnung 5).

Eine der beiden vorbereiteten Ligaturen im Bereich des Basohyal wurde geschlossen und ein PE20-Schlauch (G1, S. 96) wurde in das Gefäß eingeschoben und mit der zweiten vorbereiteten Ligatur fixiert. Der PE-Schlauch wurde über eine T-Verbindung an eine Peristaltikpumpe angeschlossen, während an dem zweiten Ausgang des T-Verbinders ein Drucksensor (G11, S. 96) angeschlossen war, um während der Eichung des Flusssignals den Perfusionsdruck überprüfen zu können. Anschließend wurde die aPA auch im Bereich des Epihyal mit einer Ligatur verschlossen und es wurde an dieser Stelle ebenfalls ein PE20-Schlauch eingeschoben und fixiert. Dieser Schlauch war an ein weiteres Stück PE90-Schlauch (G1, S. 96) angeschlossen, über den der Perfusionsdruck durch Höhenänderung des Auslaufs eingestellt wurde (s. Zeichnung 5).



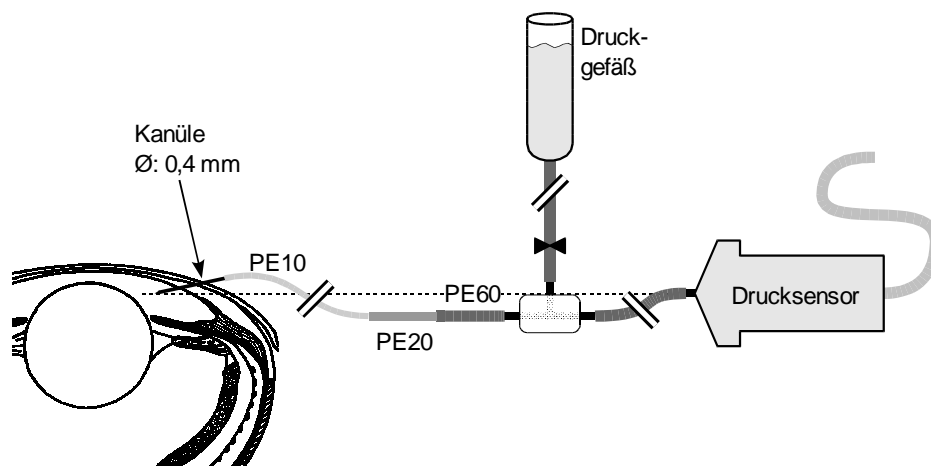
Zeichnung 5: Schematische Darstellung der Präparation zur Eichung des Flusssignals.

Die aPA wurde vor und hinter dem auf den Ceratohyal aufgeschraubten Dopplerkristall katheterisiert. Mit einer Peristaltikpumpe wurde dann Blut durch die aPA gepumpt. Der Perfusionsdruck wurde kontinuierlich kontrolliert und über die Auslaufhöhe des ausführenden Katheters auf den während des Versuchs in der dorsalen Aorta gemessenen Blutdruck eingestellt.

Zur Eichung des Flusssignals wurde Blut mit unterschiedlichen, bekannten Flussraten mit einer Peristaltikpumpe (G16 und G17, S. 97) durch die aPA gepumpt. Der Perfusiondruck, der sich bei jedem Wechsel der Flussrate änderte, wurde durch die Höhenjustierung des Auslaufes des ausführenden Schlauches konstant gehalten. Es wurde immer der Druck eingestellt, der dem aufgezeichneten Blutdruck in der DA während der vorherigen Flussmessung entsprach. Da über die efferente Kiemenarterie des ersten Kiemenbogens eine direkte, großlumige Verbindung von der DA zur aPA besteht, wurde davon ausgegangen, dass der Druck in der aPA dem in der DA gleicht. Zur Eichung wurden Flussraten gewählt, die sowohl niedriger als auch höher als die während des Versuches gemessenen waren.

3.3.2.3 Messung des Augeninnendruckes

Für die Messung des intraretinalen PO_2 musste das Auge eröffnet werden. Dies hätte sich auf den Augeninnendruck (IOP, *intra-ocular-pressure*) und damit auch auf die Durchblutung der im Augapfel gelegenen Gefäßsysteme auswirken können. Da die Erhöhung des PO_2 im Auge u.a. von der Durchblutung des choroidalen *Rete mirabile* abhängt, wurde überprüft, inwieweit die für die intraretinale Sauerstoffmessung notwendige Präparation des Auges sich auf den IOP auswirkte.



Zeichnung 6: Anordnung für die Messung des intraokularen Drucks.

Der IOP wurde in der vorderen Augenkammer gemessen. Über das Druckgefäß konnte kurzzeitig ein erhöhter Druck im Messsystem eingestellt werden.

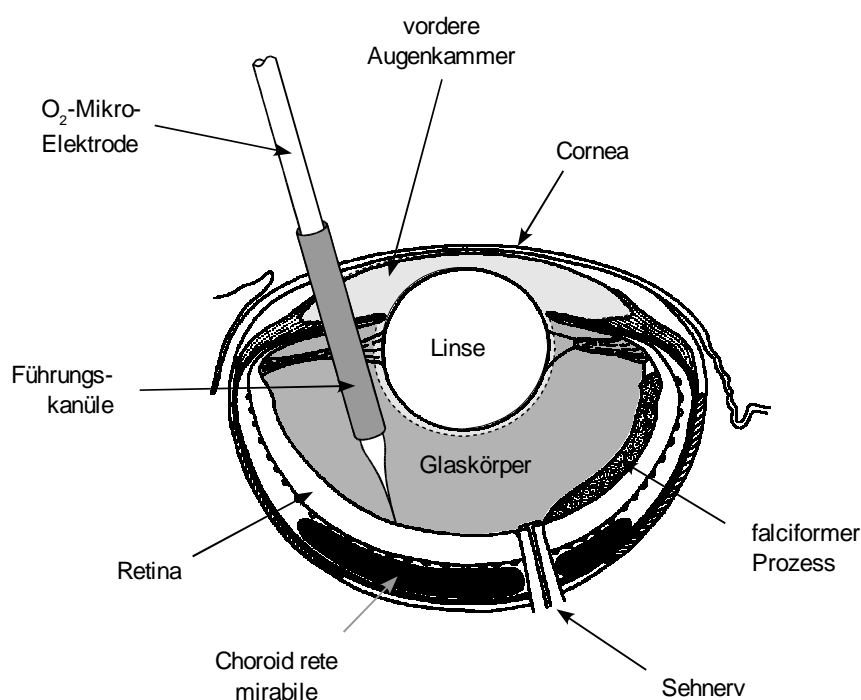
Das System zur Druckmessung ist in Zeichnung 6 dargestellt. Es bestand aus einer abgeschnittenen 0,4 mm Injektionskanüle, die über ein kurzes Stück PE10-Schlauch (G1, S. 96) und zwei weitere kurze Schlauchstücke an einen T-Verbinder angeschlossen war. Ein Ausgang des T-Verbinders war über ein PE60-Schlauchstück an einen Drucksensor (G11, S. 96) angeschlossen, während der zweite Ausgang an ein offenes Gefäß angeschlossen war, mit dem über Höhenveränderung ein hydrostatischer Druck von maximal 40 cm Wassersäule eingestellt werden konnte. Das ganze System wurde mit Forellen-Ringer (C6, S. 95) gefüllt und die Schlauchverbindung zum offenen Gefäß mit einer Arterienklemme verschlossen.

Für die IOP-Messung wurde eine katheterisierte Forelle seitlich auf den Fischhalter gelegt und künstlich ventiliert. Die 0,4 mm Injektionskanüle wurde durch die Cornea in die vordere Augenkammer eingestochen und der Drucksensor wurde auf Augenhöhe justiert. Der IOP wurde kontinuierlich aufgezeichnet. Nach Erreichen eines konstanten Wertes wurde das Auge wie für die intraretinale PO_2 -Messung präpariert (s.

3.3.2.4) und die aus den einzelnen Präparationsschritten resultierenden Änderungen im IOP wurden beobachtet.

3.3.2.4 Messung des intraretinalen Sauerstoffpartialdruckes

Die Herstellung der Sauerstoffmikroelektroden sowie die Messanordnung werden in Kapitel 3.6, ab S. 36 beschrieben. Eine katheterisierte Forelle wurde mit der Seite auf den Fischhalter gelegt und künstlich ventiliert. Für die Ableitung des intraretinalen PO_2 wurden die Fische neben der Narkose mit MS222 zusätzlich mit Pancuronium® (C2, S. 95) relaxiert. Dieses Medikament diente der Lähmung der quergestreiften Muskulatur, da auch hohe Konzentrationen des Betäubungsmittels MS222 die spontanen Ventilationsbewegungen der Fische nicht vollständig unterdrücken konnten. Diese Bewegung der *Opercula* verursachten Kopfbewegungen, die eine Messung des intraretinalen PO_2 mit den Mikroelektroden unmöglich machten.



Zeichnung 7: Schematische Darstellung der Anordnung für die intraretinalen PO_2 -Messung.

Cornea und Iris wurden zur Einführung der Führungs-kanüle punktiert. Die Sauerstoffmikroelektrode wurde dann durch die Führungs-kanüle bis zur Retina vorgeschoben.

Zur Einführung der Sauerstoffmikroelektrode in das Auge wurden entweder Cornea und Linse entfernt oder Cornea und Iris wurden am ventralen Augenrand punktiert. Dies wurde entweder von Hand mit einer 1,5 mm Kanüle oder mit einer an ein Hochfrequenz-Elektrochirurgie-Gerät (G18, S. 97) angeschlossenen 1,5 mm Kanüle durchgeführt.

Nach Punktion von Cornea und Iris wurde eine Führungs-kanüle (Außendurchmesser: 1,5 mm, Länge: 10 mm) in die Öffnung eingesteckt und bis in den Glaskörper vorgeschoben. Die Sauerstoffmikroelektrode wurde nun mit einem elektronisch gesteuerten (G19, S. 97) Mikromanipulator (G20, S. 97) durch die Führungs-kanüle in den Glaskörper vorgefahren und mit der Spitze bis in die Nähe der inneren Oberfläche der Retina vorgeschoben (s. Zeichnung 7). Durch den Einsatz der Führungs-kanüle in die Punktionsöffnung wurde eine mechanische Beschädigung der empfindlichen Spitze der Sauerstoffmikroelektrode durch Kontakt

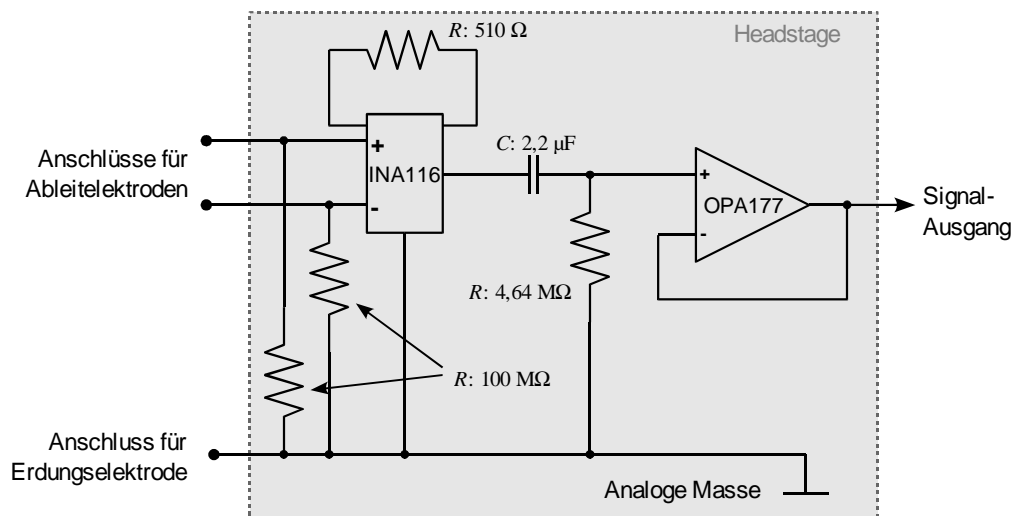
mit der Iris oder der Linse vermieden. Eine in der Rückenmuskulatur fixierte Referenzelektrode (s. 3.6.3, S. 39) diente als Erdungselektrode für die Sauerstoffmessung.

Bei Öffnung des Auges durch Entfernen der Cornea und Linse konnten die Spitze der Sauerstoffmikroelektrode unter mikroskopischer Kontrolle direkt auf die Oberfläche der Retina aufgesetzt werden. Wurde die Elektrode durch Punktion der Cornea und Iris ins Auge eingeführt, so konnte die ungefähre Lage der Sauerstoffmikroelektrode im Auge durch indirekte Ophthalmoskopie (G21, S. 97) durch das Operationsmikroskop beobachtet werden. Die exakte Position der Spitze in Relation zur Oberfläche der Retina war aber nicht genau zu erkennen. Durch die Präparation des Auges und die Anordnung des Mikromanipulators wurde die Elektrode nicht senkrecht sondern in einem kleinen Winkel auf die Retina aufgesetzt. Die Messungen des intraretinalen PO_2 erfolgten immer im zentralen Bereich der Retina in der Nähe des posterioren Augenpols.

Die Aufzeichnung des PO_2 begann mit dem Einschieben der Sauerstoffmikroelektrode in das Auge. Es wurde dann ein Sauerstoffprofil durch die Retina gemessen, indem die Sauerstoffmikroelektrode in kleinen Schritten in die Retina vorgeschoben wurde, bis keine weitere Erhöhung des PO_2 mehr beobachtet werden konnte. Vor jedem Vorschub der Elektrode wurde die Einstellung eines konstanten Signals abgewartet.

3.3.2.5 Ableitung des Elektretinogramms

Als Elektroden zur Ableitung des Elektretinogramms (ERG) wurden drei chlorierte Silberdrähte (G22, S. 97) verwandt, die an eine auf einem Mikromanipulator (G23, S. 97) befestigten Headstage (elektrische Schaltung s. Zeichnung 8) angeschlossen wurden.



Zeichnung 8: Schematischer Schaltplan der Headstage für die ERG-Aufzeichnung.

Für die Anschlüsse der beiden Ableitelektroden und der Erdungselektrode waren drei Buchsen an der Vorderseite der Headstage angebracht. Das Signal wurde durch einen Instrumentenverstärker (INA 116) 100-fach verstärkt. Zur Filterung langsamer Signalschwankungen war ein Hochpass ($C: 2,2 \mu F$, $R: 4,64 M\Omega$) nachgeschaltet. Der nachfolgende Operationsverstärker (OPA 177) diente der Impedanzwandlung des Signals.

Eine ringförmig gebogene Elektrode wurde auf die Cornea aufgelegt und diente als Ableitelektrode für das ERG. Ein weitere Elektrode wurde in die Riechöffnung eingeführt und durch eine Naht am Kopf fixiert. Der Erdungskontakt der Headstage wurde mit einer in der Rückenmuskulatur angebrachten Elektrode (s. 3.6.3, S. 39) verbunden.

Die Ableitelektroden wurden an die beiden Eingänge eines Instrumentenverstärkers (G24, S. 97, s. Zeichnung 8, S. 28 „INA 116“) angeschlossen, an dem über einen Widerstand ein fester Verstärkungsfaktor von 100x eingestellt worden war. Ein nachgeschalteter Hochpass mit einer Zeitkonstante von $\tau = 10,3$ s diente dem Herausfiltern langsamer Potentialänderungen zwischen den beiden Ableitelektroden. Das Signal wurde anschließend mit einem Operationsverstärker gepuffert und an einen Labormessverstärker weitergeleitet.

Zur Auslösung eines ERGs wurde eine gelbe LED (G25, S. 97) verwandt, die wenige Millimeter über der Pupille des Auges positioniert wurde. Die Leuchtdauer der LED konnte in acht (von 0,6 bis 10,6 ms), die Intensität in elf Stufen über einen Bereich von 6 Größenordnungen (von 0,16 mcd bis 50 cd) verstellt werden.

Über einen Trigger wurde die Aufzeichnung eines ERGs gestartet und die LED aktiviert. Dabei wurde die Auslösung der LED über eine elektronische Schaltung (Steuerschaltung für LED: Eigenbau) verzögert. Es konnte somit ein Vorlauf des ERG-Signals sowie die Auslösung der LED und die folgende Reaktion der Retina vollständig erfasst werden.

Die Änderung der ERGs während der Dunkeladaptation wurde überprüft. Zusätzlich wurde die Auswirkung der Leuchtdauer und -intensität der LED auf die Form des ERGs getestet.

Während der intraretinalen Sauerstoffmessung wurde die Funktionalität der Retina in regelmäßigen Abständen durch die Aufzeichnung von ERGs überprüft. Dabei wurde eine Verzögerung der Reizauslösung von 800 ms, eine maximale Leuchtdauer von 10,6 s und eine -intensität von 50 cd der LED eingestellt. Um eine Auswirkung von Hell- bzw. Dunkeladaptation auf die ERG-Parameter auszuschließen, wurde das Labor mindestens 30 min vor Beginn der ERG-Aufzeichnungen abgedunkelt.

3.4 Perfusion isolierter Augen in vitro

Bei der Perfusion isolierter Augen wurde die Abhängigkeit des intraretinalen PO_2 vom Root-Effekt als maßgeblichen Faktor für die Erhöhung des PO_2 untersucht. Dazu wurden zwei unterschiedliche Perfusionslösungen (Erythrozytensuspensionen) vorbereitet (s. 3.4.3, S. 31). In der ersten Suspension sollte der Root-Effekt noch nicht ausgelöst sein, d.h. durch eine pH-Verschiebung im Blut sollte im perfundierten isolierten Auge eine Freisetzung des O_2 vom Hämoglobin noch möglich und dementsprechend ein erhöhter intraretinaler PO_2 messbar sein. In der zweiten Suspension sollte durch Voreinstellung eine Auslösung des Root-Effektes im Auge nicht mehr möglich sein, was in einem reduzierten intraretinalen PO_2 resultieren sollte. Um über den pH-Wert der ersten Suspension gezielt die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins und damit das Ausmaß des Root-Effekts einstellen zu können, wurde vor den Perfusionsexperimenten in einer Messreihe die Abhängigkeit der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins vom pH-Wert der Erythrozytensuspension bestimmt (s. 3.4.2, S. 30). Als Suspension mit einem bereits vollständig ausgelösten Root-Effekt wurde entweder eine stark angesäuerte Suspension von Forellenerythrozyten eingesetzt, oder es wurden Humanerythrozyten verwandt, da menschliches Hämoglobin keinen Root-Effekt aufweist.

Für die Perfusion isolierter Augen wurde einigen Forellen Blut abgenommen und gewaschen (s. 3.4.1, S. 30). Am Folgetag wurde das Blut auf mehrere Proben aufgeteilt und für das Perfusionsexperiment äquilibriert (s. 3.4.3, S. 31). Eine Forelle wurde künstlich ventiliert und ein Auge wurde freipräpariert, die Augenarterie katheterisiert und das isolierte Auge dann perfundiert (s. 3.4.4, S. 32). Anschließend wurde der intraretinale PO_2 bei der Perfusion mit unterschiedlichen Erythrozytensuspensionen gemessen (s. 3.4.5, S. 32). Während der Perfusion wurde der Perfusionsdruck überwacht. Der durch die Ansaugung des Blutes im Schlauchsystem entstehende Unterdruck wurde überprüft.

3.4.1 Blutentnahme und -behandlung

Zur Blutentnahme wurden einige Forellen mit einer hohen Konzentration von 150 mg l^{-1} MS222 narkotisiert. Nach vollständig eingetretener Narkose wurde den Forellen mit einer heparinisierten (C7, S. 95) 5 ml Einmalspritze und 0,9 mm Kanüle aus der Kaudalvene Blut entnommen.

Das Blut wurde anschließend mit eisgekühlter Forellen-Ringerlösung (C9, S. 95) gewaschen. Dazu wurden das Blut auf einige 10 ml - Zentrifugenröhrchen verteilt und 1 min bei geringer Umdrehung in einer Tischzentrifuge (G26, S. 97) zentrifugiert. Das Plasma wurde verworfen und die Erythrozyten wurden mit eisgekühlter Forellen-Ringerlösung resuspendiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Das Blut wurde dann über Nacht in einem Erlenmeyerkolben im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und am nächsten Morgen vor dem Versuch erneut dreimal gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde der Hämatokrit (Hct) der Erythrozytensuspension auf einen Wert von 0,20 eingestellt.

Bei der Verwendung von Humanerythrozyten wurden eine gerade verfallene Blutkonserve, die freundlicherweise von der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin, zur Verfügung gestellt worden war, verwandt. Das Humanblut wurde genau wie das Forellenblut behandelt.

Für *in vitro* – Perfusionen isolierter Augen wurde das Blut morgens mit einer veränderten Forellen-Ringerlösung (C10, S. 96) dreimal gewaschen und anschließend auf vier Proben aufgeteilt, die in einem Farhi-Tonometer (FARHI, 1965, G27, S. 97) bei der Versuchstemperatur von 15°C mit verschiedenen Gasgemischen äquilibriert wurden (s. 3.4.3, S. 31). Die Einstellung der Gasgemische erfolgte mit Gasmischpumpen (G28, S. 97).

3.4.2 Bestimmung des Root-Effekts

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins vom pH-Wert der Erythrozytensuspension wurde eine Suspension von Forellenerythrozyten auf vier Proben aufgeteilt und unter unterschiedlichen Bedingungen im Farhi-Tonometer äquilibriert. Die pH-Werte der Proben wurden durch

- Äquilibration mit unterschiedlichen CO_2 -Partialdrücken (P_{CO_2} ; G8, S. 96),
 - Zugabe von HCl zu einigen der Proben und/oder
 - Austausch eines Teils des Plasmas gegen Ringerlösung mit einer anderen Bikarbonatkonzentration
- über einem Bereich von 6,0 - 8,5 eingestellt. In allen vier Proben wurde dann der pH und die Gesamt- O_2 -Konzentration gemessen. Um die Konzentration des an Hämoglobin gebundenen O_2 zu berechnen wurde die Menge des physikalisch gelösten O_2 in der Erythrozytensuspension mit einem Löslichkeitskoeffizienten (α_{O_2}) von $1,7745 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1} \text{ Torr}^{-1}$ (BOUTILIER *et al.*, 1984) berechnet und von der gemessenen Gesamt- O_2 -Konzentration subtrahiert. Der Anteil fester Bestandteile in den Erythrozyten wurden dabei mit einem Faktor von 0,67 berücksichtigt.

$$[\text{O}_2]_{\text{Hb}} = [\text{O}_2]_{\text{gesamt}} - P_{\text{O}_2} \cdot \alpha_{\text{O}_2} \cdot (0,67 \cdot \text{Hct}) \quad (2)$$

Berechnung der Konzentration des an Hämoglobin gebundenen O_2 ($[\text{O}_2]_{\text{Hb}}$).
 $[\text{O}_2]_{\text{gesamt}}$: Gesamt- O_2 -Konzentration in der Probe / α_{O_2} : Löslichkeitskoeffizient des O_2 / Hct: Hämatokrit

Da die Einzelproben durch Aufteilung einer Gesamtprobe mit einem Hct von 0,20 gewonnen worden waren, wiesen sie übereinstimmende Hämoglobinkonzentration auf. Die an Hämoglobin gebundene Menge O_2 ($[O_2]_{Hb}$) wurde daher als direktes Maß für den Root-Effekt betrachtet.

3.4.3 Äquilibration von Blutproben für die Augenperfusion

Folgende Erythrozytensuspensionen wurden für die Perfusion von isolierten Augen vorbereitet:

Perfusat A: Suspension von Forellenerythrozyten mit hoher Sauerstoffsättigung des Hämoglobins. Der pH-Wert des Perfusats A wurde durch eine Bikarbonatkonzentration von 5,4 mM und einem PCO_2 von 2,0 Torr bei der Äquilibration auf ca. 7,5 eingestellt. Bei diesem pH-Wert sollte das Hämoglobin noch zum größten Teil mit O_2 gesättigt sein, eine weitere Ansäuerung sollte aber über den Root-Effekt eine deutliche Freisetzung von O_2 zur Folge haben. Durch diese Wahl der Parameter sollte im Auge eine Desoxygenierung des Hämoglobins und damit die Erzeugung hoher PO_2 ermöglicht werden.

Perfusat B bzw. Hu: Suspension von Forellen- (B) oder Humanerythrozyten (Hu). Im Gegensatz zu Perfusat A sollte in diesem Perfusat durch eine Ansäuerung keine weitere Freisetzung von O_2 vom Hämoglobin mehr möglich sein. Der pH-Wert des Perfusats B wurde dafür durch Säurezugabe um ca. 0,5 pH-Einheiten saurer eingestellt als in Perfusat A, so dass der Root-Effekt des Hämoglobins zum größten Teil ausgelöst und damit die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins minimal war. Da menschliches Hämoglobin keinen Root-Effekt aufweist, war beim Perfusat Hu keine besondere Vorbehandlung erforderlich. Beide Perfusate wurden wie Perfusat A mit einem PCO_2 von 2,0 Torr äquilibriert.

In Vorversuchen mit Perfusat B waren bei der Perfusion der Augen mit diesem Medium sehr hohe Perfusionsdrucke von teilweise über 1 bar aufgetreten. Gleichmaßen hohe Drucke konnten bei Perfusion mit Perfusat A nicht beobachtet werden. Als Ursache für die exzessiv hohen Drucke bei Perfusat B wurde daher die Ansäuerung der Probe vermutet. Alternativ zu Probe B wurde daher das Perfusat Hu eingesetzt, das wegen des Fehlens des Root-Effekts beim menschlichen Hämoglobin die Sauerstoffkonzentrierung im Auge nicht unterstützen konnte. Bei diesem Perfusat erübrigte sich daher auch die Ansäuerung zur Auslösung des Root-Effektes.

Suspension C: Suspension von Forellenerythrozyten mit vollständig ausgelöstem Root-Effekt. Diese Suspension diente als Kontrolle für eine minimale, Root-Effekt bedingte, Sauerstoffsättigung des Hämoglobins. Dazu wurde die Erythrozytensuspension entweder durch Säurezugabe oder durch Äquilibration mit einem sehr hohen PCO_2 von über 30 Torr auf einen pH-Wert von deutlich unter 7,0 angesäuert.

Suspension D: Suspension von Forellenerythrozyten mit vollständiger Sauerstoffsättigung. Suspension D wurde als Kontrolle für eine maximale, vom Root-Effekt noch unbeeinflusste, Sauerstoffsättigung des Hämoglobins verwandt. Dazu wurde sie vor der Äquilibration erneut zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die Erythrozyten wurden mit Forelleneringer mit einer Bikarbonatkonzentration von 10 mM resuspendiert. Zusätzlich wurde die Suspension mit Luft ($PCO_2 = 0,25$ Torr) äquilibriert, um einen pH von über 8,0 zu erzielen. In diesem pH-Bereich hat der Root-Effekt noch nicht eingesetzt und das Hämoglobin ist vollständig mit O_2 gesättigt (ROOT, 1931; INGERMANN, 1982).

Im Vergleich zu den Suspensionen C und D konnten die Perfusate A und B bezüglich der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins und damit bezüglich des Ausmaßes des Root-Effekts eingeordnet werden.

Alle Erythrozytensuspensionen wurden durch ein Filter mit einer Maschenweite von 40 μm filtriert (G29 u. G30, S. 97). Dadurch wurden kleine Verklumpungen entfernt, die zu einem Verstopfen der Gefäße im Auge führen könnten. Die Proben wurden im Farhi-Tonometer bei einer Temperatur von 15°C für mindestens 45 min vor Versuchsbeginn äquilibriert.

3.4.4 Augenpräparation

Um die Unterbrechung der Blutversorgung der zu isolierenden Augen so kurz wie möglich zu halten, wurden die Präparationen an lebenden, betäubten Forellen durchgeführt. Die Augenarterie wurde dabei erst unmittelbar vor dem Einschieben des Perfusionskatheters verschlossen und die Perfusion direkt nach Katheterisierung gestartet.

Eine Forelle wurde seitlich auf den Fischhalter gelegt und künstlich ventiliert. Die Haut um das Auge herum wurde entfernt und sämtliche Augenmuskeln wurden vom Augapfel abgetrennt. Anschließend wurde die *A. ophthalmica* von ihrem Eintritt in die Augenhöhle bis zum Eintritt in den Augapfel neben dem Sehnerv freigelegt. Zwei Ligaturen um die *A. ophthalmica*, eine an der Eintrittsstelle in die Augenhöhle, die andere kurz vor dem Augapfel, wurden vorbereitet.

Durch einen mit leichtem Druck auf die Cornea aufgelegten Edelstahlring wurde das Auge in Position gehalten und über einen Schlauch mit temperiertem Wasser (15°C) überströmt.

Die Cornea wurde dann mit einer 1,5 mm Kanüle punktiert und das Auge wurde wie für die Messung des intraretinalen PO_2 präpariert (s. 3.3.2.4, S. 27). Als Referenzelektrode wurde eine Krokodilklemme an der Augenhalterung befestigt.

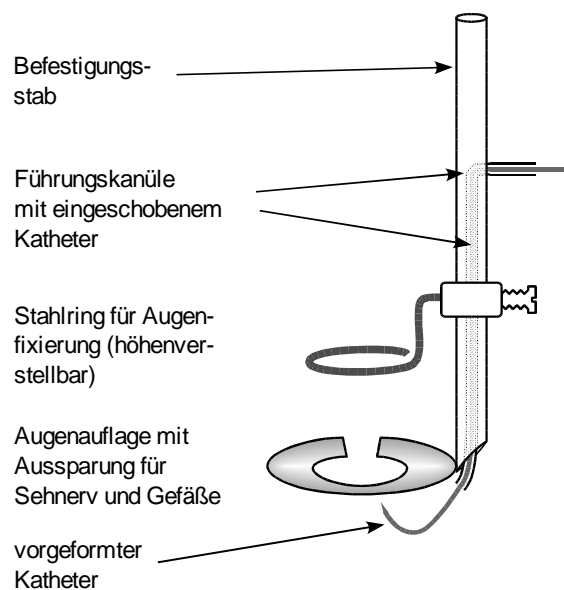
3.4.5 Augenperfusion und intraretinaler Sauerstoffpartialdruck

Perfusion

Die Perfusion der isolierten Augen (s. Zeichnung 10, S. 33) erfolgte mit einer Peristaltikpumpe (G16, S. 97) und einem geeigneten Pumpenschlauch ENE03 (G17, S. 97) bei einem konstanten Fluss von $180 \mu\text{l min}^{-1}$ und unter ständiger Kontrolle des Perfusionsdrucks kurz vor dem Auge.

Eine speziell angefertigte Augenhalterung (s. Zeichnung 9) wurde unter das Auge geschoben und der an der Halterung angebrachte Perfusionskatheter (PE10, G1, S. 96) neben der *A. ophthalmica* positioniert. Die Ligatur am Eintritt der *A. ophthalmica* in die Augenhöhle wurde dann verschlossen, das Gefäß durch einen kleinen Schnitt geöffnet und der Katheter eingeschoben und mit der zweiten vorbereiteten Ligatur fixiert. Anschließend wurde der Sehnerv, sowie die *Vena ophthalmica* und die *A. ophthalmica* unterhalb des Katheters durchtrennt und das Auge in der Augenhalterung aus der Augenhöhle entnommen. Mit dem Befestigungsstab wurde die Augenhalterung an einem Stativ fixiert.

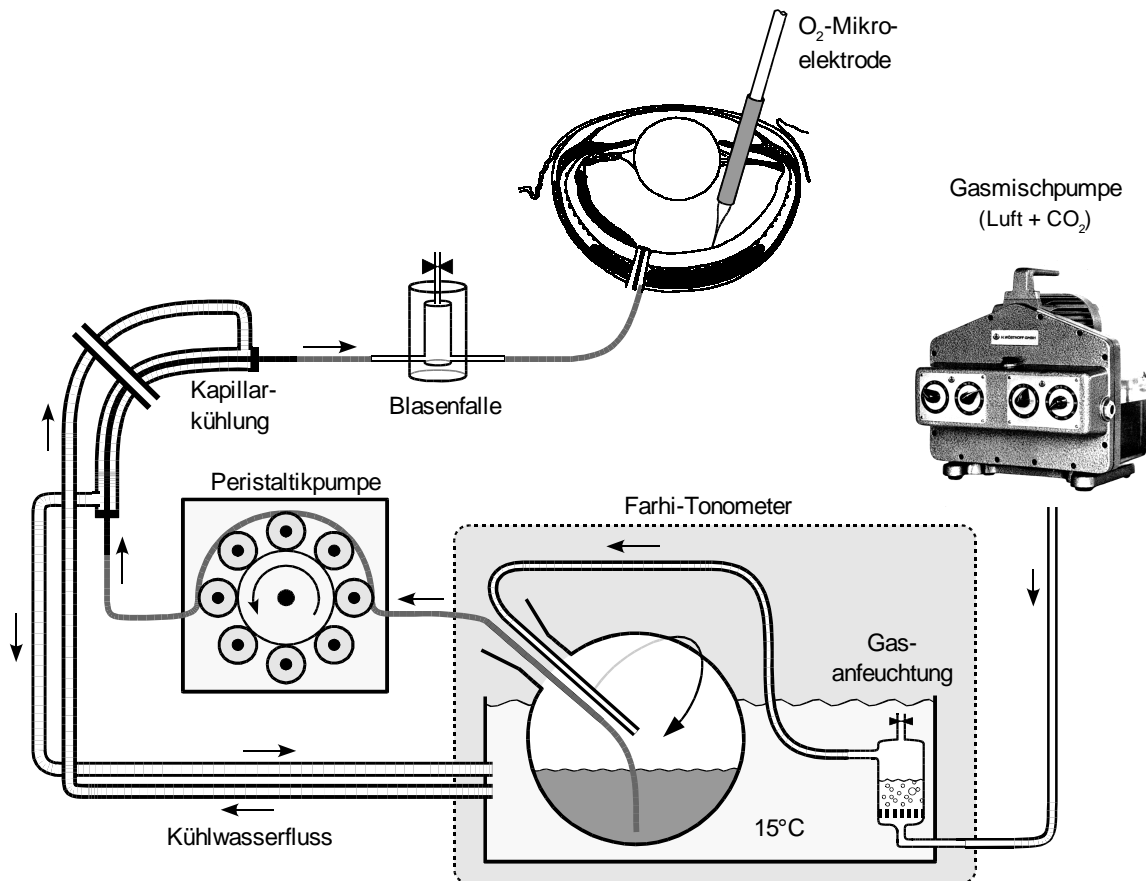
Zwei der vier Rundkolben des Farhi-Tonometers waren über Schläuche und ein Miniaturventil (G31, S. 98) an die Peristaltikpumpe angeschlossen (in Zeichnung 10, S. 33 nicht eingezeichnet), so dass während der Perfusion wahlweise zwischen den Perfusaten A und B, bzw. Hu, und Ringerlösung umgeschaltet werden konnte.



Zeichnung 9: Augenhalterung für die intraretinale Sauerstoffmessung an isolierten Augen.

Die Erythrozytensuspensionen wurden mit der Peristaltikpumpe aus dem Farhi-Tonometer angesaugt und durch eine thermostatisierte Edelstahlkapillare mit nachgeschalteter Blasenfalle in das isolierte Auge gepumpt. Hinter der Blasenfalle, kurz vor dem Eintritt ins Auge, war über ein T-Stück ein Drucksensor (G11, S. 96) zur Kontrolle des Perfusionsdrucks angeschlossen (in Zeichnung 10 nicht eingezeichnet).

Zur Überprüfung des Ansaug-Unterdrucks wurde in einer Versuchsreihe zwischen dem Miniaturventil und der Peristaltikpumpe über einen T-Verbinder ein Drucksensor (G11, S. 96) angeschlossen.



Zeichnung 10: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Perfusion isolierter Augen.

Suspensionen von Forellen- bzw. Humanerythrozyten wurden mit einem Gasgemisch in einem Farhi-Tonometer äquilibriert und thermostatisiert. Das jeweilige zur Perfusion eingesetzte Perfusat wurde von einer Peristaltikpumpe aus dem Tonometer angesaugt und durch eine ebenfalls thermostatisierte Stahlkapillare und eine Blasenfalle zum Auge gepumpt. Kurz vor dem Auge wurde der Perfusionsdruck überprüft (nicht eingezeichnet).

Das Schlauchsystem wurde vor der Katheterisierung der *A. ophthalmica* mit heparinisierter Forellen-Ringerlösung (C8, S. 95) gefüllt. Nach erfolgreichem Anschluss des Katheters wurde das Gefäßsystem des Auges zuerst mit Forellen-Ringerlösung gespült, dann mit Perfusat A für die weitere Präparation perfundiert.

Intraretinale Sauerstoffpartialdruckmessung

Während der Präparation zur Einführung der Sauerstoffmikroelektrode (s. 3.3.2.4, S. 27) wurde das Auge mit Perfusat A perfundiert, da dabei durch Auslösung des Root-Effektes eine Erhöhung des PO_2 im Auge möglich war (s. 3.4.3, S. 31). Während der Einführung der Mikroelektrode war eine Beobachtung der Elektrodenspitze im Glaskörper wegen der Anbringung des Auges in der Augenhaltung nicht möglich. Die Elektrode wurde daher ohne visuelle Kontrolle mit einem Mikromanipulator (G19 u. G20, S. 97) in kurz

aufeinander folgenden Schritten von 100 μm in das Auge vorgeschoben. Sobald ein Anstieg des PO_2 zu verzeichnen war, wurde die Schrittweite auf 25 μm verringert und die Elektrode wurde vorgeschoben, bis der PO_2 nicht weiter anstieg. In dieser Position wurde die Sauerstoffmikroelektrode für den restlichen Versuchsverlauf fixiert.

Das Auge wurde dann abwechselnd mit den Perfusaten A, B bzw. Hu und Forellen-Ringerlösung perfundiert. Eine Umschaltung auf ein anderes Medium erfolgte jeweils, sobald sich ein stabiler PO_2 eingestellt hatte. Die Änderungen des intraretinalen PO_2 und des Perfusionsdrucks wurden aufgezeichnet.

3.5 Analytik

pH-Wert

Zur Bestimmung des pH-Wertes von Lösungen, Blutproben oder Erythrozytensuspensionen wurde eine temperierte pH-Mikroelektrodenanordnung verwandt (G32, S. 98). Das Gerät wurde auf die Versuchstemperatur von 15°C temperiert. Das Signal der pH-Elektrode wurde an jedem Versuchstag mit Präzisionspuffern (G33, S. 98) kalibriert.

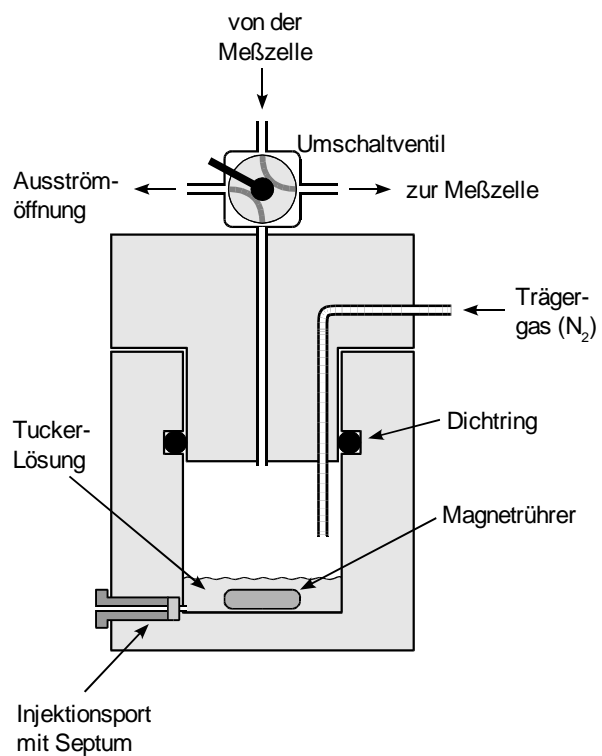
Gesamt-Sauerstoffkonzentration

Der Gesamt-Sauerstoffgehalt von Blutproben oder Erythrozytensuspensionen wurde mit einem TasCon (G34, S. 98) gemessen.

In einer Extraktionskammer wird durch chemische Umwandlung des Hämoglobins einer Blutprobe der O_2 von seiner Bindung an Hämoglobin gelöst. Dieser O_2 , sowie der in dem Flüssigkeitsanteil der Probe physikalisch gelöste O_2 , werden dann durch einen kontinuierlichen Trägergasstrom, aus der Extraktionskammer in die Messzelle des TasCons gespült. In der Messzelle befindet sich eine polarographische Sauerstoffelektrode mit einer großflächigen Kathode, an der der O_2 während des Gasstromes durch Messzelle vollständig reduziert wird. Dies führt zu einem Peak im Signal der polarographischen Elektrode. Die Menge des reduzierten O_2 entspricht dem Integral des Peaks. Das TasCon wird durch Injektion von Luftproben mit bekanntem Sauerstoffgehalt geeicht.

Als Extraktionsgefäß konnte nicht die mit dem Gerät gelieferte Standardkammer verwandt werden. Bei dieser Kammer perlt das Trägergas (G35, S. 98) durch die Lösung und führte so bei Blut- bzw. Plasmaproben zu starkem Aufschäumen.

Es wurde daher eine spezielle Kammer für Blut- und Plasmaproben angefertigt (s. Zeichnung 11), in der das Trägergas nicht durch die Lösung, sondern durch einen Gaszufluss-Port knapp oberhalb des



Zeichnung 11: Extraktionskammer zur Gesamt- O_2 -Gehalts-Bestimmung.

Die Probe wurde durch ein Septum direkt in die Extraktionslösung injiziert, in der O_2 von Hämoglobin freigesetzt wird. Der O_2 gelangte dann mit dem Trägergas zur Messkammer des O_2 -Analysators (TasCon).

Flüssigkeitsspiegels geleitet wurde. Die Extraktion des O_2 aus der Lösung wurde durch einen Magnetrührer unterstützt.

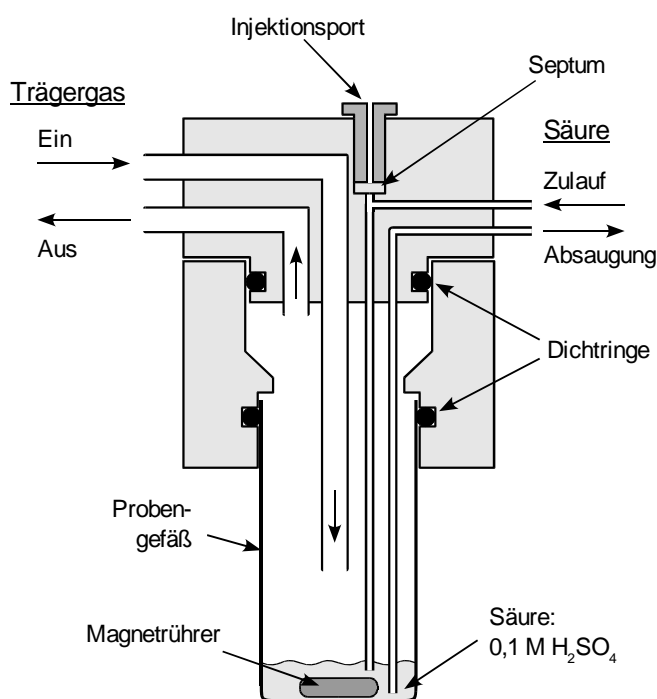
Die Extraktionskammer wurde mit 1 ml der von TUCKER (1967) beschriebenen Lösung (G36, S. 98) plus 10 μ l 1-Octanol befüllt. Das Trägergas wurde durch eine Edelstahlkanüle durch den Deckel der Kammer in die Extraktionskammer eingeleitet. Eine knapp über dem Gefäßboden seitlich angebrachte Bohrung, die durch ein Septum verschlossen wurde, diente als Injektionsport für Proben (Volumen 10 μ l). Diese wurden direkt in die Extraktionslösung injiziert. Auf den Deckel der Kammer war ein Vierwege-Ventil (G31, S. 98) montiert, durch das der Gasstrom entweder zur Messung der Gesamt- O_2 -Konzentration in die Messzelle des TasCon, oder zum Spülen der Kammer zur Ausströmöffnung geleitet werden konnte.

Gesamt-Kohlendioxid-Gehalt

Der Gesamt- CO_2 -Gehalt, die Konzentration an Bikarbonat und gelöstem CO_2 , wurde in erythrozytenfreiem Suspensionsmedium bestimmt. Dazu wurden Blut oder Erythrozytensuspension in Hämatokrit-Glasröhrchen (Volumen 40 μ l, G37, S. 98) in einer Compur-Zentrifuge (G38, S. 98) zentrifugiert und der Überstand für die Messung verwandt.

Die Bestimmung des Gesamt- CO_2 -Gehaltes erfolgte nach Extraktion mit einem URAS (Ultra-Red-Absorbance-Spectrophotometer, G39 S. 98). Für dieses Messsystem wurde eine spezielle Kammer (s. Zeichnung 12, HETZ und WASER, unveröffentlicht) eingesetzt. Die Kammer bestand aus einem Deckel mit zwei Gasanschlüssen für die Zu- und Ableitung des Trägergases (N_2 , G40, S. 98), zwei Anschlüssen für die Zufuhr und Abfuhr des Extraktionsmediums (0,1 M H_2SO_4), sowie dem Injektionsport für die Proben. Darunter befand sich eine Halterung mit einem eingesteckten Probengefäß aus Glas.

Das Trägergas wurde mit konstanter Flussrate (G7, S. 96) von 50 ml min^{-1} durch die Referenzkammer des URAS, von dort in die Extraktionskammer und dann durch die Messkammer des URAS geleitet (HETZ, 1994). Durch die Extraktionskammer wurde mit kontinuierlicher Rate Säure eingepumpt und mit geringfügig höhere Rate wieder abgesaugt. Die leicht erhöhte Absaugrate verhinderte eine Überfüllung der Kammer mit Säure und ein Eindringen der Säure in die Messkammer des URAS. Zur Analyse einer Probe wurde die Säureabsaugung mit einem Magnetventil kurzzeitig verschlossen, um die Probe für eine ausreichende Extraktionszeit in der Messkammer zu halten. Durchmischung der Probe mit Säure wurde durch einen Magnetrührer im Glasgefäß bewirkt.



Zeichnung 12: Extraktionskammer für Gesamt- CO_2 -Messung.

Die durch den Injektionsport eingegebene Probe wird mit der einströmenden Säure in das Extraktionsgefäß gespült. Das extrahierte CO_2 gelangt dann mit dem Trägergas in die Messkammer des CO_2 -Analysators (URAS).

Der Injektionskanal mündete im Zuflusskanal für die Säure, so dass injizierte Proben, in der Regel je 20 µl, durch einströmende Säure in das Extraktionsgefäß transportiert wurden. Nach Umwandlung des Bikarbonats in CO₂ und Übertritt in die Gasphase gelangte das CO₂ mit dem Trägergas in die Messkammer des URAS.

Das durch die Säure extrahierte CO₂ veränderte die Infrarot-Absorption des Trägergases und resultierte in einem Peak im Signal des URAS, der mit Hilfe eines Computer integriert wurde. Zur Eichung der Messsystems wurden Proben bekannter Bikarbonatkonzentration injiziert.

Nach Ende der Analyse eines Peaks öffnete sich das Magnetventil der Säureabsaugung automatisch und Probe und eingeleitete Säure wurden abgesaugt.

Die Bikarbonatkonzentration wurde aus dem Gesamt-CO₂-Konzentration berechnet, indem der Anteil physikalisch gelösten CO₂ vom Gesamt-CO₂-Gehalt subtrahiert wurde. Die Bestimmung dieser physikalisch gelösten Fraktion erfolgte aus dem PCO₂, mit dem die Proben äquilibriert worden waren, und einem nach HEISLER (1986) für die jeweiligen Lösungen berechneten Löslichkeitskoeffizienten.

Sauerstoffpartialdruck

Der PO₂ von Blutproben oder Erythrozytensuspensionen wurde mit polarographischen Sauerstoffelektroden (G41, S. 98) in einer auf die Versuchstemperatur von 15°C thermostatisierten Kammern (N. HEISLER und W. NÜSSE in: BRIDGES, 1983) gemessen. Die Eichung der Sauerstoffelektroden erfolgte durch Durchleiten von Luft und N₂ durch die Messkammer. Der Korrekturterm „Blut-Gas-Faktor“, eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Elektroden gegenüber Gasen (Eichung) und Flüssigkeiten (Proben), wurde durch Messung einer mit Luft äquilibrierten Blutprobe bestimmt.

Hämatokrit

Der Hct wurde mit einer Compur-Zentrifuge (G38, S. 98) mit Hämatokritröhrchen von ca. 9 µl Volumen oder Plasmagewinnungsröhrchen mit einem Volumen von 40 µl (G37, S. 98) bestimmt.

3.6 Sauerstoffmikroelektroden

3.6.1 Herstellung

Die für die intraokulare Sauerstoffmessungen eingesetzten Sauerstoffmikroelektroden (Schema s. Zeichnung 13, S. 38) wurden in Anlehnung an die Methode von LINSSENMEIER und YANCEY (1987) angefertigt. Die Herstellung erforderte folgende Schritte (Details s.u.): Ausziehen der Kapillaren, Kürzen der Spitzen auf den gewünschten Durchmesser, Füllen mit niedrigschmelzender Metalllegierung unter Belassung eines Hohlraumes im Bereich der Kapillarspitze („*Recess*“), Einlöten eines Kupferdrahtes in die Legierung für elektrischen Anschluss, elektrolytische Gold-Plattierung der Legierungsoberfläche im Hohlraum der Kapillarspitze, Testen der Elektrode.

Unbehandelte 1 mm – Borosilikat-Glaskapillaren (G42, S. 98) wurden mittig in einen Horizontal-Kapillarpuller (G43, S. 98) eingespannt und zu zwei gleichen Kapillaren mit einem Spitzendurchmesser von < 1 µm ausgezogen. Zum Füllen mit der Metalllegierung wurde durch Kürzen der Spitzendurchmesser auf ca. 5 µm vergrößert. Dazu wurden die Spitzen der Kapillaren mittels eines Mikromanipulators (G23, S. 97) schräg auf einen Objektträger aufgesetzt, so dass nur die zu kürzende Spitze über die Kante des Objektträgers hinausragte. Diese wurde dann durch Entlangfahren an der Objektträgerkante mit einem weiteren Objektträger abgebrochen.

Zur Füllung der Kapillaren mit Metall wurde eine Legierung nach LINSSENMEIER und YANCEY (1987, G44, S. 98) verwandt. Diese Legierung zeichnet sich durch einen sehr niedrigen Schmelzpunkt von 47,2°C aus und hat gegenüber der häufig für ähnliche Zwecke verwandten „*Woods Metal*“ – Legierung einen wesentlich kleineren Ausdehnungskoeffizienten. Diese Eigenschaft führte zu einer erheblichen Erhöhung der Ausbeute bei der Elektrodenfertigung.

Zur Herstellung kurzer Stifte dieser Legierung wurde etwas Metall im Trockenschrank (G3, S. 96) bei 60°C geschmolzen. Gleichzeitig wurde eine Einmalspritze mit einem angeschlossenen PE20 – Schlauch (G1, S. 96) ebenfalls im Trockenschrank aufgewärmt. Die verflüssigte Legierung wurde in den PE20-Schlauch eingezogen und erstarrte bei Raumtemperatur in wenigen Sekunden. Der gefüllte PE-Schlauch wurde anschließend in Stücke von ca. 8 mm Länge geschnitten und die Metallkerne entnommen.

Je ein Metallstift wurde in eine Kapillare bis zur Schulter eingeschoben und durch Auflegen der Kapillare auf eine Heizplatte bei einer Temperatur von 56°C geschmolzen. Durch Ausschleudern der Kapillare von Hand wurde die Legierung weiter in die Spitze vorgetrieben. Das Lumen der Kapillare war dann im Schulterbereich vollständig mit Legierung gefüllt. Anschließend wurde die Legierung erneut geschmolzen und mit Druck unter Belassung eines Recesses bis in die Spitze der Kapillare vorgeschoben. Dazu wurde die Kapillare horizontal in einen Mikromanipulator (G23, S. 97) eingespannt. An das hintere Ende wurde über einen Schlauch mit einem T-Stück eine Luftpumpe (G4, S. 96) angeschlossen. Die Kapillare wurde jetzt unter mikroskopischer Kontrolle an die Heizplatte gebracht. Nach Schmelzen der Legierung und Einschalten der Luftpumpe wurde das Metall durch den Luftdruck bis in die Spitze vorgedrückt. Dieser Vorgang wurde durch ständiges leichtes Klopfen an die Kapillare unterstützt. Sobald die Legierung bis auf ca. 100 µm an das Ende der Kapillare vorgedrungen war, wurde die Heizplatte entfernt. Durch Anblasen der Kapillare von der Spitze her wurde die Legierung abgekühlt.

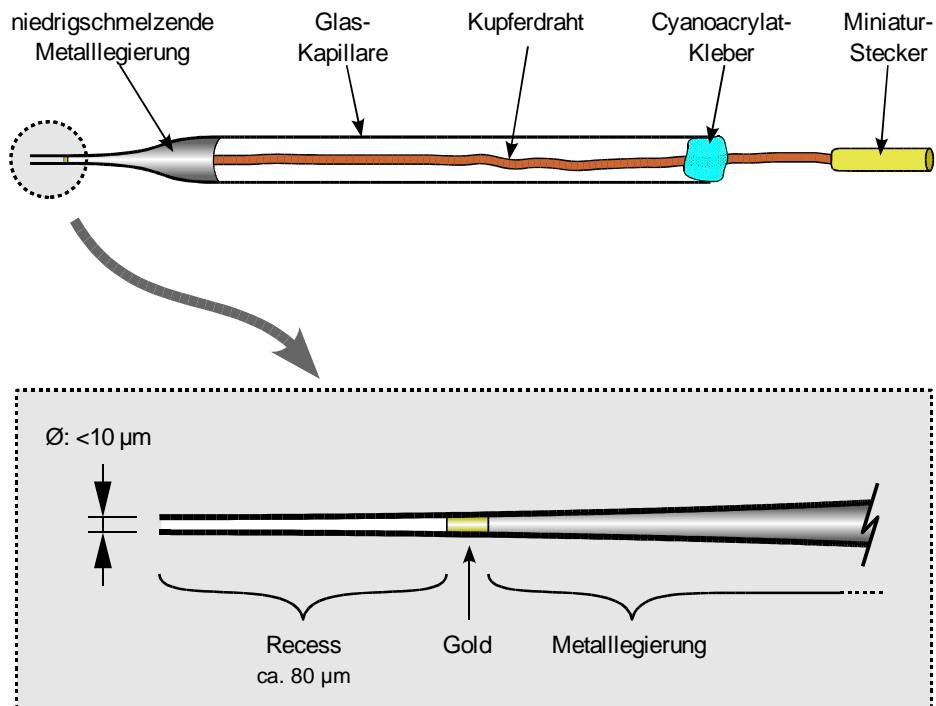
Im nächsten Arbeitsschritt wurde für den elektrischen Anschluss der Elektrode ein Kupferdraht in die Legierung eingelötet. Die Elektrode wurde erneut horizontal in den Mikromanipulator eingespannt und soweit durch eine Heizwendel geschoben, dass beim Einschalten der Heizwendel nur der hinterste Bereich der Legierung schmolz.

In die geschmolzene Legierung wurde der Kupferdraht eingeschoben und durch Ausschalten der Heizwendel und leichtes Anblasen eingelötet. Mit einem Tropfen Cyanoacrylatkleber wurde der Kupferdraht am hinteren, offenen Ende der Kapillare fixiert. Für späteren Anschluss an die Messelektronik wurde ein Miniaturstecker angelötet.

Abschließend wurde die Oberfläche der Legierung im Recess elektrolytisch mit Gold beschichtet. Hierzu wurde die Spitze der Elektrode in Plattierungslösung (G45, S. 99) getaucht. Als Anode diente ein Platindraht in der Lösung. Nach Anlegen einer Spannung von 1,5 V an Elektrode und Anode wurde der Fortschritt der Goldabscheidung unter dem Mikroskop kontrolliert. Die endgültige Länge des Recesses wurde mit einem Messokular überwacht und über die Dauer der Plattierungszeit geregelt (s. Zeichnung 13, S. 38).

3.6.2 Testverfahren

Fertige Elektroden wurden für 24 h mit der Spitze in Wasser eingetaucht aufbewahrt und anschließend auf ihre Empfindlichkeit getestet. Dazu wurden sie in ein Gefäß mit 0,9%iger NaCl-Lösung eingetaucht, die über eine Glasfritte mit N₂ (G40, S. 98), Luft oder verschiedenen Gasgemischen äquilibriert werden konnte. Als Referenzelektrode wurde ein chlorierter Silberdraht in die Lösung eingetaucht. Elektroden, die in luft-äquilibrierter Lösung ein zu hohes Signal aufwiesen, wurden verworfen. Zur zusätzlichen Charakterisierung wurden von einigen Elektroden Polarogramme aufgezeichnet.



Zeichnung 13: Schematischer Aufbau einer Sauerstoffmikroelektrode.

Eine zu einer feinen Spitze ausgezogene Kapillare wurde erst unter Belassung eines Recess mit einer niedrigschmelzenden Metalllegierung gefüllt, in die ein Kupferdraht mit Stecker eingelötet wurde. Auf die Oberfläche der Legierung innerhalb des Recess wurde anschließend elektrolytisch Gold aufplattiert.

Die Linearität der Sauerstoffmikroelektroden wurde durch Aufzeichnung des Elektrodensignals bei verschiedenen PO_2 von 0 bis 760 Torr überprüft. Unterschiedliche PO_2 – Werte wurden durch Mischungen von N_2 und O_2 (G40, S. 98) mit Präzisions-Gasmischpumpen (G28, S. 97) eingestellt.

Nach dem Test wurden die Elektroden erneut für 24 h gewässert und bis zur Verwendung trocken gelagert.

3.6.3 Messverfahren

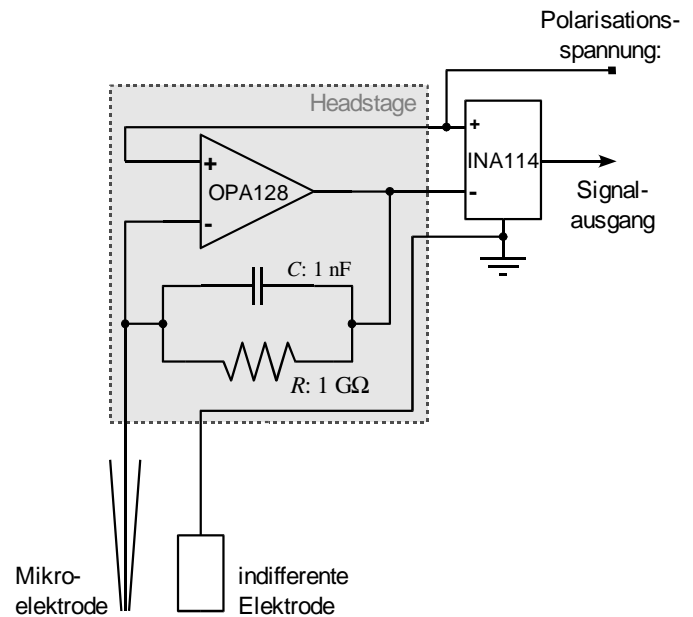
Die Sauerstoffmikroelektrode wurde an den invertierenden Eingang eines Operationsverstärkers (s. Zeichnung 14, S. 39 „OPA128“, G46, S. 99) angeschlossen, an dessen nicht invertierenden Eingang die Polarisationsspannung von -0,8 V angelegt wurde. Da bei der Reduktion von O_2 an der Mikroelektrode nur sehr kleine Ströme im nA-Bereich auftreten, wurde dieser Operationsverstärkertyp ausgewählt: er weist einen sehr kleinen Eingangswiderstand und damit sehr geringen Fehlerstrom auf. In den Rückkopplungspfad des Operationsverstärkers war ein 1 G Ω -Widerstand und ein 1 nF-Kondensator eingelötet (s. Zeichnung 14, S. 39 „R“ und „C“). Der Widerstand im Rückkopplungspfad diente der Strom-Spannungs-Wandlung. Es wurde ein Widerstand mit einem sehr hohen Widerstandswert ausgewählt, damit bei den sehr kleinen Strömen bei der Sauerstoffmessung eine messbare Spannungsänderung erzielt werden konnte. Bei Abwesenheit von O_2 an der Mikroelektrode fließt kein Strom und am Ausgang des Operationsverstärkers liegt die Polarisationsspannung an. Bei der Reduktion von O_2 an der Mikroelektrode fließt ein Strom durch die Elektrode und damit auch durch den Widerstand, wodurch an dem Widerstand eine Spannung abfällt, die zu einer Veränderung der Spannung am Ausgang des Operationsverstärkers führt.

Ein nachgeschalteter Instrumentenverstärker (s. Zeichnung 14, S. 39 „INA114“, G46, S. 99) misst die Differenz zwischen der fest eingestellten Polarisationsspannung und der durch die Reduktion von O_2 an der Mi-

kroelektrode veränderte Spannung am Ausgang des Operationsverstärkers. Dieses dem PO_2 proportionale Signal wurde mit einem Labormessverstärker für die weitere Verarbeitung konditioniert.

Der Operationsverstärker war in eine abgeschirmte Headstage eingebaut, die über einen Anschlussstutzen an einem Mikromanipulator (G20, S. 97) befestigt werden konnte. An der Vorderseite der Headstage war eine Stange zur Befestigung der Sauerstoffmikroelektrode angebracht. Die Mikroelektrode wurde über feine Teflon-isolierte Buchsen direkt an der Frontseite der Headstage zusammen mit der Referenzelektrode angeschlossen.

Die Referenzelektrode für die intraretinale PO_2 – Messung wurde in der Rückenmuskulatur des Versuchstieres implantiert. Hierzu wurde direkt hinter dem Kopf der narkotisierten Forelle ein kurzer Schnitt in der Rückenmuskulatur gesetzt, in den ein ringförmig gebogener chlorierter Silberdraht als Referenzelektrode eingesetzt wurde. Der Schnitt wurde durch eine Naht wieder verschlossen und der ableitende Silberdraht so fixiert.



Zeichnung 14: Schematischer Schaltplan für die Messung mit Sauerstoffmikroelektroden.

Über die Rückkopplung des Operationsverstärkers liegt an der Elektrode eine konstante Polarisationsspannung an. Durch Reduktion von O_2 an der Spitze der Elektrode ändert sich die Ausgangsspannung des Operationsverstärkers, die dann durch einen Instrumentenverstärker mit der ursprünglichen Polarisationsspannung verglichen wird.

3.7 Datenerfassung und -auswertung

Die kontinuierliche Aufzeichnung der Versuchsdaten erfolgte mit einem Computer.

Die einzelnen Signale wurden über analoge Isolations-Labormessverstärker (N. HEISLER, Eigenbau) geeignet verstärkt und an eine Analog/Digital-Wandlerkarte (G47, S. 99) weitergeleitet. Die digitalisierten Signale wurden dann mit speziell für die Anforderungen der einzelnen Versuche programmierten ViewDAC- bzw. TestPoint-Programmmodulen (G48, S. 99) verarbeitet und auf Festplatte gespeichert.

Die elektrischen Signale wurden mit bekannten Standards (pH: Präzisionspuffer, G33, S. 98; PO_2 : Luft und N_2 , G40, S. 98; Druck: Druckeichgerät, G12, S. 96) täglich, in einigen Fällen mehrmals täglich, kalibriert.

Geringfügige Abweichungen zwischen Eichungen vor und nach dem Versuch wurde rechnerisch kompensiert. Dabei wurde davon ausgegangen, dass sich das entsprechende Signal über den gesamten Versuchszeitraum kontinuierlich verändert hatte.

Signale niedriger Frequenz

Signale, die keine hohe zeitliche Auflösung erforderten, wurden mit einer Frequenz von 8 Hz erfasst und über die Berechnung eines Blockmittelwertes über 2 s mit 0,5 Hz aufgezeichnet. Dazu gehörten die Signale

für pH, PO_2 (Blutproben und Mikroelektrode) und die Druckmessungen (Augeninnendruck, Blutdruck, Perfusionsdrucke).

pH-Signal: Das Signal der pH-Messung wurde mit einer speziellen Analyseroutine automatisch ausgewertet (s. Abbildung 1). Die Routine wurde durch einen Trigger manuell gestartet. Ein untergeordnetes Programmmodul kontrollierte dann nach einer initialen Wartephase von 1 min die Drift des Signals der pH-Elektrode. Sobald diese Drift über einen Zeitraum von 10 s kleiner als $0,002 \text{ pH-Einheiten min}^{-1}$ war, wurde der pH-Wert abgespeichert (s. Abbildung 1).

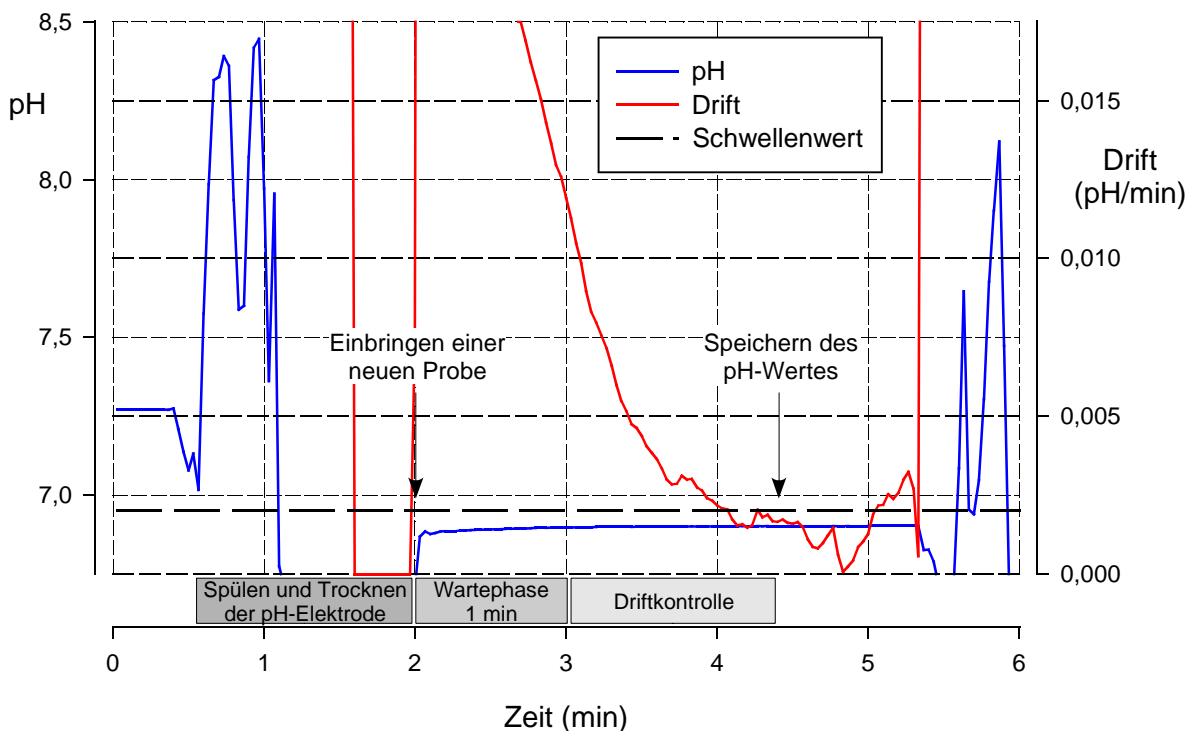


Abbildung 1: Aufzeichnung und Analyse des pH-Signals.

Nach dem Spülen und Trocknen der pH-Elektrode wurde eine neue Probe eingegeben und durch einen Trigger wurde die Auswertung gestartet („Einbringen einer neuen Probe“). Das Programm wartete dann erst eine Minute und überwachte anschließend die Drift des pH-Signals. Blieb die Drift für 10 s unter einem Schwellenwert von $0,002 \text{ pH-Einheiten min}^{-1}$, wurde der pH-Wert gespeichert („Speichern des pH-Wertes“).

Sauerstoffpartialdruck: Das Signal der PO_2 -Elektrode konnte während des Versuchsverlaufs nicht automatisch analysiert werden. Nach Beendigung des Versuchs wurden daher die einzelnen PO_2 -Werte anhand der Daten der kontinuierlichen Aufzeichnung separat ausgewertet. Da sich bei der Messung des PO_2 in Blutproben wegen des Sauerstoffverbrauchs der Erythrozyten kein konstantes Signal einstellt (BRIDGES, 1983), wurde durch lineare Regression der PO_2 auf den Zeitpunkt der Probeninjektion extrapoliert (s. Abbildung 2, S. 41): Hatte sich eine konstante Änderung des Signals eingestellt, so wurde über diesen Abschnitt eine lineare Regression berechnet. Mit Hilfe der Regressionsformel wurde dann der PO_2 der Probe zum Zeitpunkt der Probeninjektion berechnet. Die im Vergleich zur Messperiode unwesentliche Verzögerung zwischen Probenentnahme und -injektion in die Messkammer wurde vernachlässigt.

Bei der Messung mit Sauerstoffmikroelektroden wurden die relevanten Bereiche aus der Datenaufzeichnung herausgesucht und über Perioden mit weitgehend konstantem Signal wurde der Mittelwert berechnet.

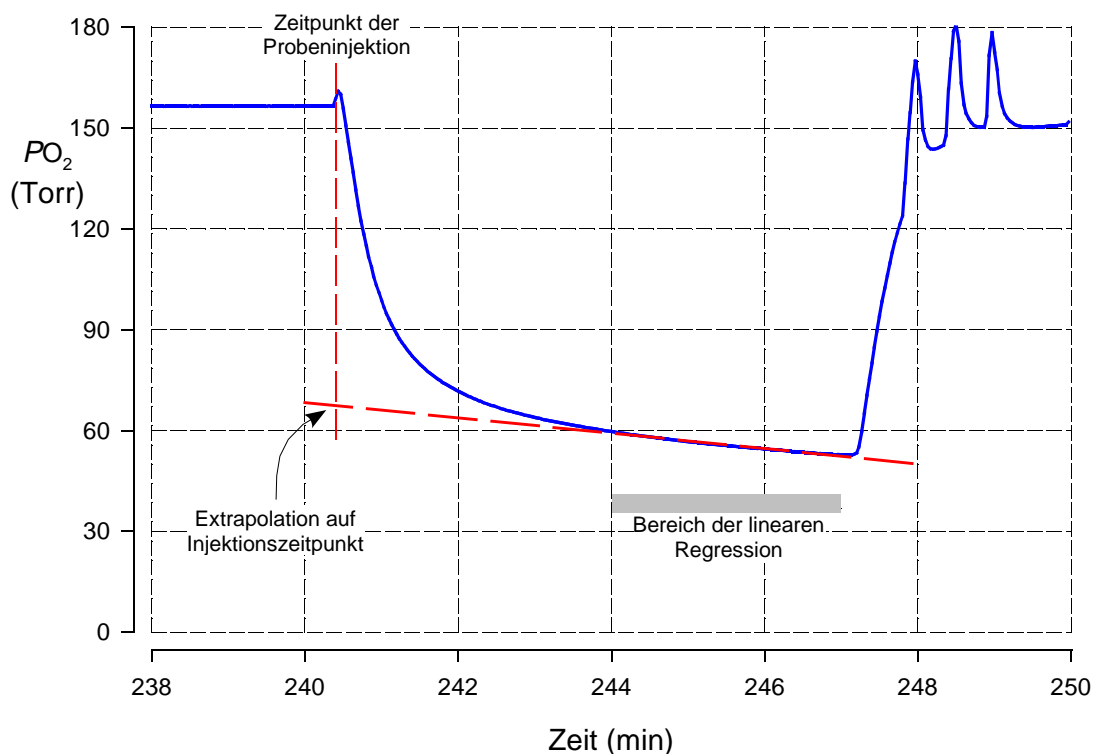


Abbildung 2: Aufzeichnung und Analyse des Signals der Sauerstoffelektrode.

Der PO_2 ist gegen die Messzeit aufgetragen. Im Bereich einer konstanten Drift des PO_2 -Signals wurde eine lineare Regression berechnet, über die auf den PO_2 zum Zeitpunkt der Probeninjektion extrapoliert wurde.

Druckmessungen: Alle Druckmessungen wurden mit der oben angegebenen Datenerfassungsrate aufgezeichnet. Absolute Kalibrierung erfolgte nach Messung von konstanten Eichdrucken (G12, S. 96).

Signale mittlerer Frequenz

Signale, die eine etwas höhere zeitliche Auflösung erforderten, wurden mit einer Frequenz von 8 Hz erfasst und aufgezeichnet. Dazu gehörten die Signale: Gesamt- O_2 - und - CO_2 -Konzentration (Peakintegration) sowie die Herzschlagfrequenz (Auswertung der periodischen Blutdruckänderungen).

Gesamt- O_2 - und - CO_2 -Konzentration: Bei beiden Messsystemen entstand durch Analyse einer Probe ein Signalpeak, dessen Fläche über Integration mit einem eingebundenen Programmmodul berechnet wurde. Die Fläche des jeweiligen Peaks wurde nach Beendigung der Integration in eine Tabelle gespeichert.

Überschritt das jeweilige Signal einen Schwellenwert, so erkannte das Programmmodul automatisch den Beginn eines Peaks und startete die Integration. Zusätzlich wurden die letzten 10 s vor der Peakerkennung mit in die Integralberechnung einbezogen. Nach Unterschreiten des Schwellenwertes am Ende des Peaks wurde die Berechnung des Integrals noch für 1 min fortgesetzt, dann erst wurde der Integralwert gespeichert. Die Schwellenwerte sowie die Zeitperioden, die vor und nach der eigentlichen Peakerkennung noch in die Integralberechnung einbezogen wurden, wurden nach eine Reihe von Testmessungen anhand der erhaltenen Peaks festgelegt und in das Programmmodul einprogrammiert.

Herzschlagsignal: Die periodische Änderungen des Blutdrucks wurden als Herzschlagsignal gespeichert. Das Signal wurde zusätzlich während der laufenden Messung kontinuierlich ausgewertet: zur Bestimmung der Herzschlagamplitude wurden alle 2 s der minimale und maximale Wert dieser Periode aufgezeichnet.

Die Herzschlagfrequenz wurde durch eine Fast Fourier Transformation berechnet. Dazu wurden Datenblocks von jeweils 8 s ausgewertet.

Signale hoher Frequenz

Elektroretinogramm und LED-Signal: Die an der LED anliegende Spannung wurde zur Erfassung des Ein- und Ausschaltzeitpunktes aufgezeichnet. Beide Signale, ERG und LED, wurden mit einer Frequenz von 5 kHz über eine Zeit von 5 s aufgezeichnet. Zusätzlich zur Speicherung der Originaldaten erfolgte eine Umrechnung der ERG-Signale (s. Abbildung 3, S. 43). Dazu wurde die Datenerfassungsrate der ERGs durch Blockmittelwertbildung von jeweils 10 Werten auf eine effektive Messfrequenz von 500 Hz reduziert. Gleichzeitig wurde der Verstärkungsfaktor des Labormessverstärkers zur Berechnung der tatsächlichen Signalamplitude einberechnet und das ursprüngliche ERG-Signal um den Signalwert vor Einschalten des Lichtreizes kompensiert.

Von jedem ERG wurden außerdem die Amplituden der a- und b-Wellen sowie die Verzögerungen der beiden Wellen in zeitlicher Relation zur Reizauslösung berechnet und aufgezeichnet (s. Abbildung 3, S. 43).

Blutflussmessung mit Ultraschall-Doppler: Die Datenerfassungsrate bei den Experimenten zur Blutflussmessung in der aPA betrug 2560 Hz, wobei die Daten in Blöcken von 512 Werten (5 Hz) analysiert wurden. Zur Aufzeichnung des Dopplersignals wurde ein Audio-Ausgang des Directional Pulsed Doppler Flowmeters (G14, S. 97) verwendet. An diesem Ausgang konnte direkt die durch den Fluss verursachte Dopplerfrequenz abgegriffen werden. Diese wurde alle 200 ms mittels einer Fast Fourier Transformation analysiert, welche als Ergebnis eine Liste von Frequenzen von 0 bis 1280 Hz mit einer Auflösung von 5 Hz ergab, sowie die zu jeder Frequenz gehörende Magnitude und Phase. Der über die Magnituden gewichtete Mittelwert der Frequenzen wurde berechnet und stellte die mittlere Dopplerfrequenz während der analysierten Zeitspanne von 200 ms dar. Dieser Wert wurde mit 5 Hz gespeichert.

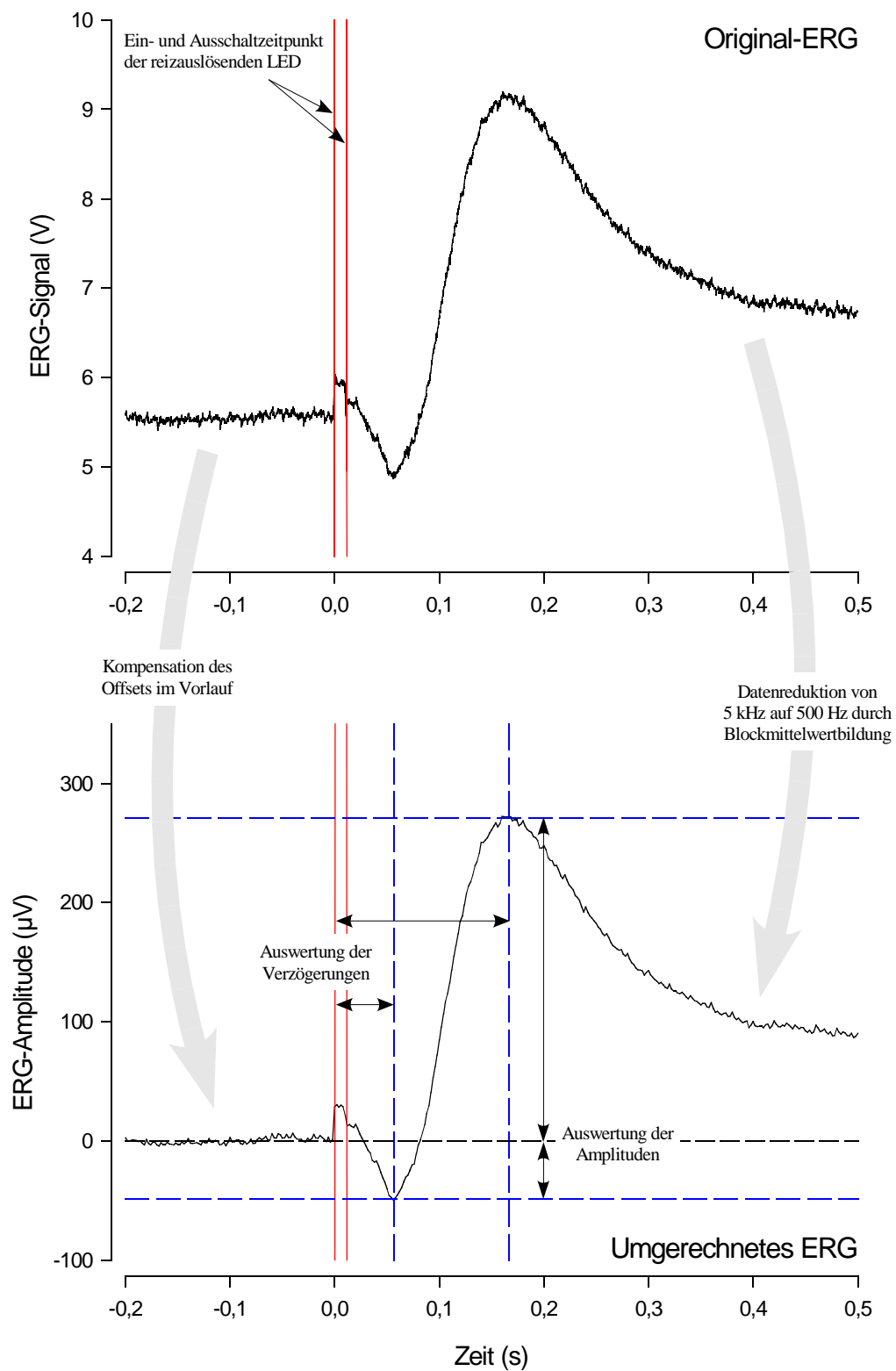


Abbildung 3: Auswertung der aufgezeichneten Elektroretinogramme (ERG).

Ausgehend vom Einschaltzeitpunkt der LED wurden die Verzögerungen der Peaks der a- und b-Welle ausgewertet. Die Amplituden der beiden Wellen wurden in Relation zum Vorlauf des Signals vor Reizauslösung bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1 Eigenschaften von Sauerstoffmikroelektroden

Die für die intraretinale PO_2 -Messung entwickelten Sauerstoffmikroelektroden wiesen einen Spitzendurchmesser von $< 10 \mu m$ und eine mittlere Recess-Länge von $77 \mu m$ auf (S.D. = $20,4 \mu m$, $n = 42$, Max = $121,4 \mu m$, Min = $21,6 \mu m$) (s. Abbildung 4). Bei einem PO_2 von 156,5 Torr (Luft) lieferten die Elektroden ein Signal von 27 pA (S.D. = $12,5 \text{ pA}$, $n = 78$, Max = 68 pA , Min = $5,3 \text{ pA}$). Dies entspricht einer Menge an reduziertem O_2 von 70 amol s^{-1} .

Bei Änderung der Polarisationsspannung an der Kathode (Polarogramm, s. Abbildung 5) zeigten die Sauerstoffmikroelektroden den für polarographische Sauerstoffelektroden typischen Signalverlauf (WHALEN *et al.*, 1967; LÜBBERS *et al.*, 1969; LINSSENMEIER und YANCEY, 1987; HAUPT *et al.*, 1991; OBER und SHARP, 1996). In einer luftäquilibrierten Lösung steigt mit abnehmender Polarisationsspannung das Signal der Sauerstoffelektrode zuerst langsam, dann schnell an und erreicht einen Plateau-Wert bei Polarisati-

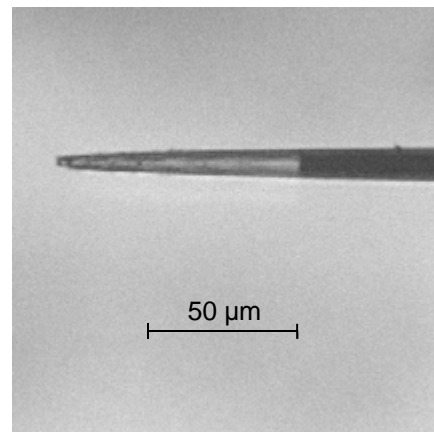


Abbildung 4: Mikroskopaufnahme der Spitze einer Sauerstoffmikroelektrode.

Die Länge des Recess beträgt ungefähr $80 \mu m$, der Spitzendurchmesser ca. $5 \mu m$.

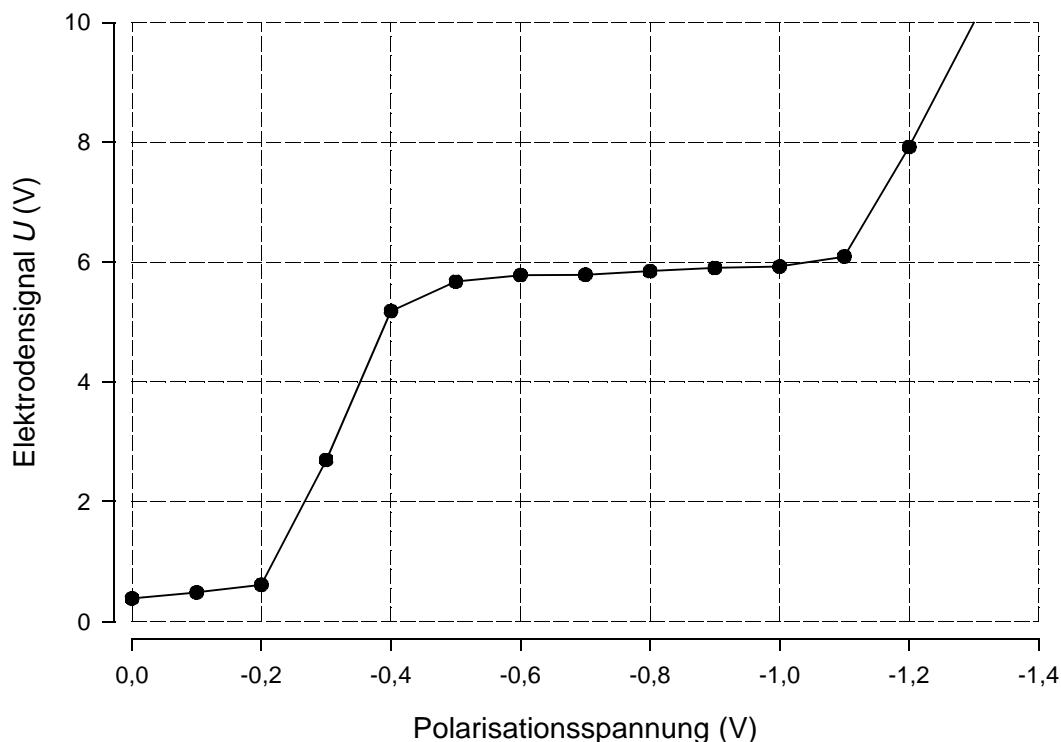


Abbildung 5: Polarogramm einer Sauerstoffmikroelektrode.

Aufgetragen ist das verstärkte Signal einer Sauerstoffmikroelektrode in luftäquilibrierter Lösung in Abhängigkeit von der angelegten Polarisationsspannung. Im Plateaubereich von ca. $0,6 - 1,0 \text{ V}$ wird der O_2 an der katalytischen Oberfläche vollständig umgesetzt; das Signal der Elektrode ist proportional zum PO_2 .

onsspannungen zwischen ca. -0,6 und 1,0 V. Bei weiterer Erhöhung der Polarisierungsspannung steigt das Signal erneut deutlich an.

Der erste Anstieg des Signals zwischen -0,2 und -0,5 V Polarisierungsspannung wird durch die bei zunehmender Polarisierungsspannung verstärkte Sauerstoffreduktion an der Kathode verursacht. Das Signal ist noch nicht durch die Diffusionsrate des O_2 zur Kathode begrenzt, da der zur Kathode diffundierende O_2 nur teilweise reduziert wird. Im Bereich des Plateaus zwischen ca. -0,6 und -1,0 V Polarisierungsspannung wird dann der gesamte zur Kathode diffundierende O_2 reduziert. Das Signal der Elektrode wird daher in diesem Bereich durch die Diffusionsrate des O_2 zur Kathode beschränkt und ist proportional zum PO_2 . Bei einer weiteren Erhöhung der Polarisierungsspannung über -1,0 V hinaus werden Protonen zu Wasserstoff reduziert. Das Signal der Elektrode steigt dadurch plötzlich an, ist aber jetzt nicht mehr allein vom PO_2 abhängig und damit nicht mehr proportional zum PO_2 .

Für den Betrieb der Sauerstoffelektroden wurde eine Polarisierungsspannung von -0,8 V gewählt. Diese liegt im Bereich des Plateaus, in dem O_2 quantitativ umgesetzt wird und noch unterhalb der für die Sauerstoffmessung maximal einsetzbaren Spannung von ca. -1,0 V.

Die Sauerstoffmikroelektroden wiesen über einen PO_2 -Bereich von 0 bis 760 Torr eine Linearität von 0,99987 auf (Mittelwert der einzelnen Korrelationen, S.D. = 0,00023, $n = 15$, s. Abbildung 6).

Wegen der in den Glasschaft zurückgezogenen katalytischen Oberfläche waren die Elektroden gegen Rühren unempfindlich (s. auch SCHNEIDERMAN und GOLDSTICK, 1978).

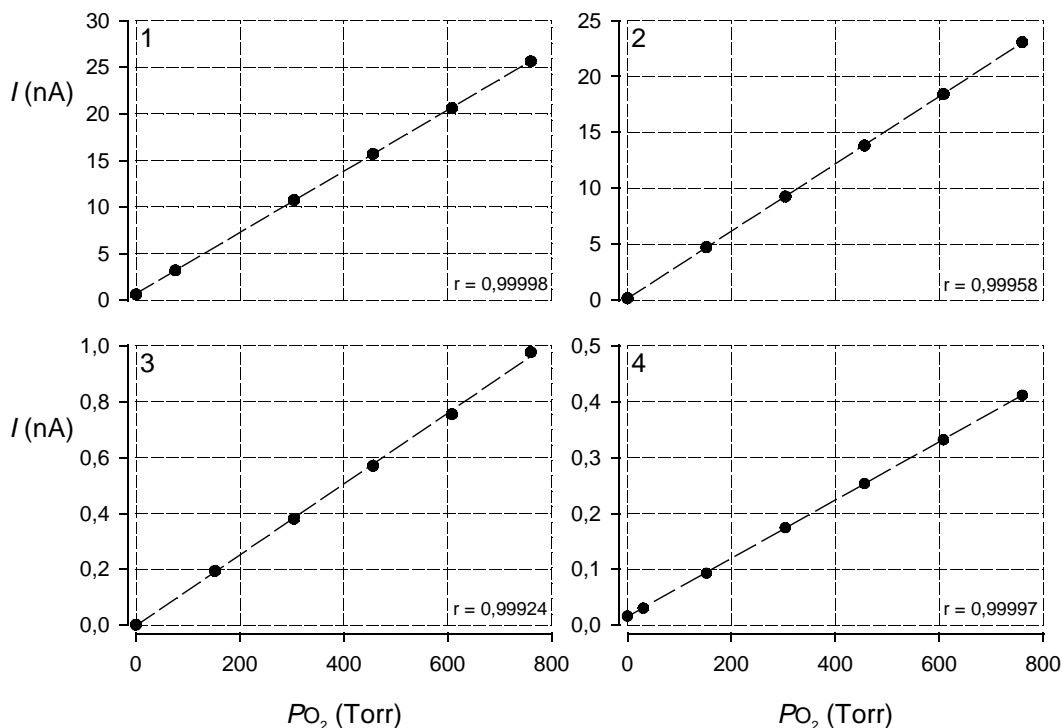


Abbildung 6: Linearität unterschiedlich empfindlicher Sauerstoffmikroelektroden.

Es ist jeweils der durch die Elektrode erzeugte Strom (I) in Abhängigkeit vom PO_2 in der Lösung aufgetragen. Die Polarisierungsspannung betrug -0,8 V, die unterschiedlichen PO_2 -Werte wurden mit einer Gasmischpumpe eingestellt.

4.2 Gefäßversorgung des Forellenauges

Wie schon von MÜLLER (1839) für den Dorsch (*Gadus morhua*), von GOODRICH (1930) für Salmoniden und von COPELAND (1980) für die Regenbogenforelle beschrieben, wird das choroidale *Rete mirabile* allein von der *A. ophthalmica*, die die efferente Arterie der Pseudobranchie darstellt, mit Blut versorgt. Die Pseudobranchie wiederum erhält oxygeniertes Blut aus der efferenten Arterie des ersten Kiemenbogens (s. Abbildung 7).

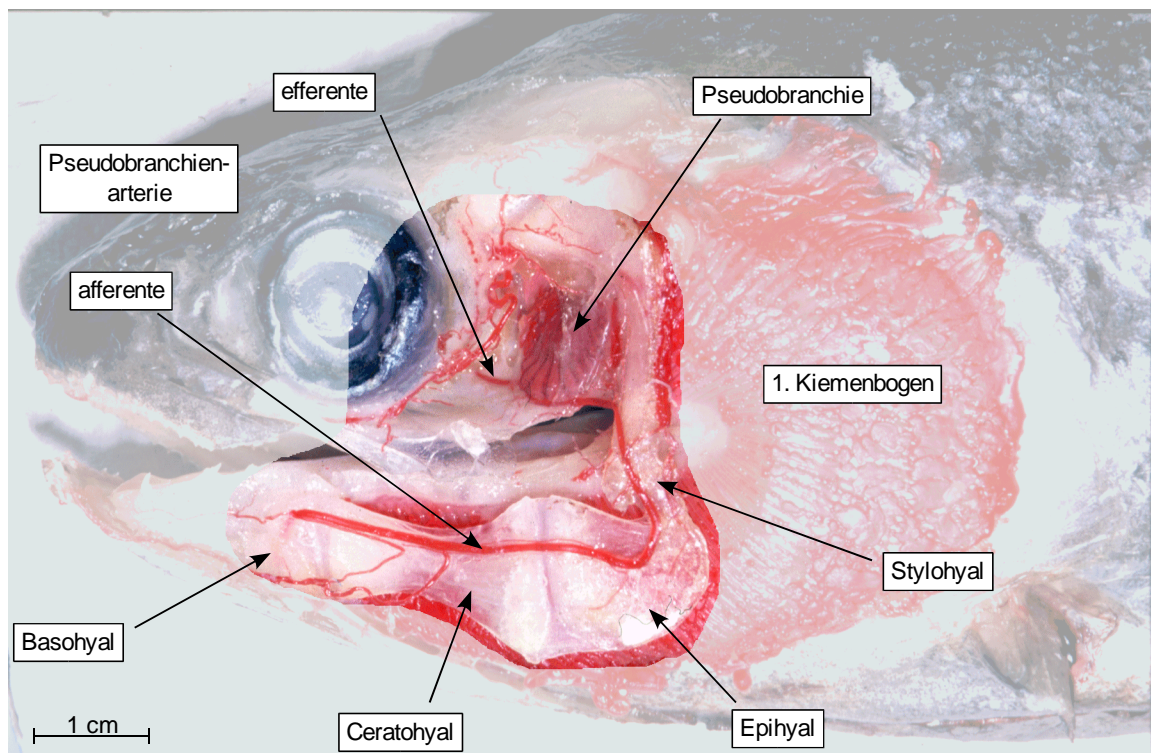


Abbildung 7: Verlauf der afferenten Arterie der Pseudobranchie.

Gefäßausguss einer Forelle, durch Entfernung des Operculums und des Maxillarbogens teilweise freipräpariert. Die aPA (= efferente Arterie des ersten Kiemenbogens) verläuft auf der Außenseite über die Knochen des Hyalbogens bis zur Pseudobranchie.

Die efferente Arterie des ersten Kiemenbogens (= aPA) durchbricht den Basohyal und verläuft dann in caudaler Richtung auf der Außenseite des Hyalbogens über Cerato-, Epi- und Stylohyal. Ungefähr in der Mitte ihres Verlaufs über den Ceratohyal zweigt ventral ein Gefäß von der aPA ab, das zur Spitze des Unterkiefers zieht. Auf dem Epihyal biegt die aPA in dorsale Richtung ab. Auf den Stylohyal zweigt ein weiteres Gefäß von der aPA Richtung cranial (in Abbildung 7 nicht sichtbar) ab und versorgt wohl Opercularmuskel. Die aPA tritt dann am ventralen distalen Pol der Pseudobranchie in diese ein und fächert sich in feinere Gefäße auf. Die efferente Arterie der Pseudobranchie verlässt diese an ihrem ventralen, proximalen Pol und verläuft weiter Richtung Körpermitte, wo sie oberhalb des Parasphenoid über eine dünne Anastomose mit der kontralateralen efferente Pseudobranchienarterie verbunden ist (s. Abbildung 8, S. 48).

Ausgehend von der nur wenige Millimeter langen Anastomose zwischen den efferenten Arterien der Pseudobranchien der beiden Körperseiten verläuft die efferente Arterie der Pseudobranchie (= *A. ophthalmica*) nach dem Eintritt in die Augenhöhle in dorsaler Richtung und dann entlang des Sehnervs bis zum Auge.

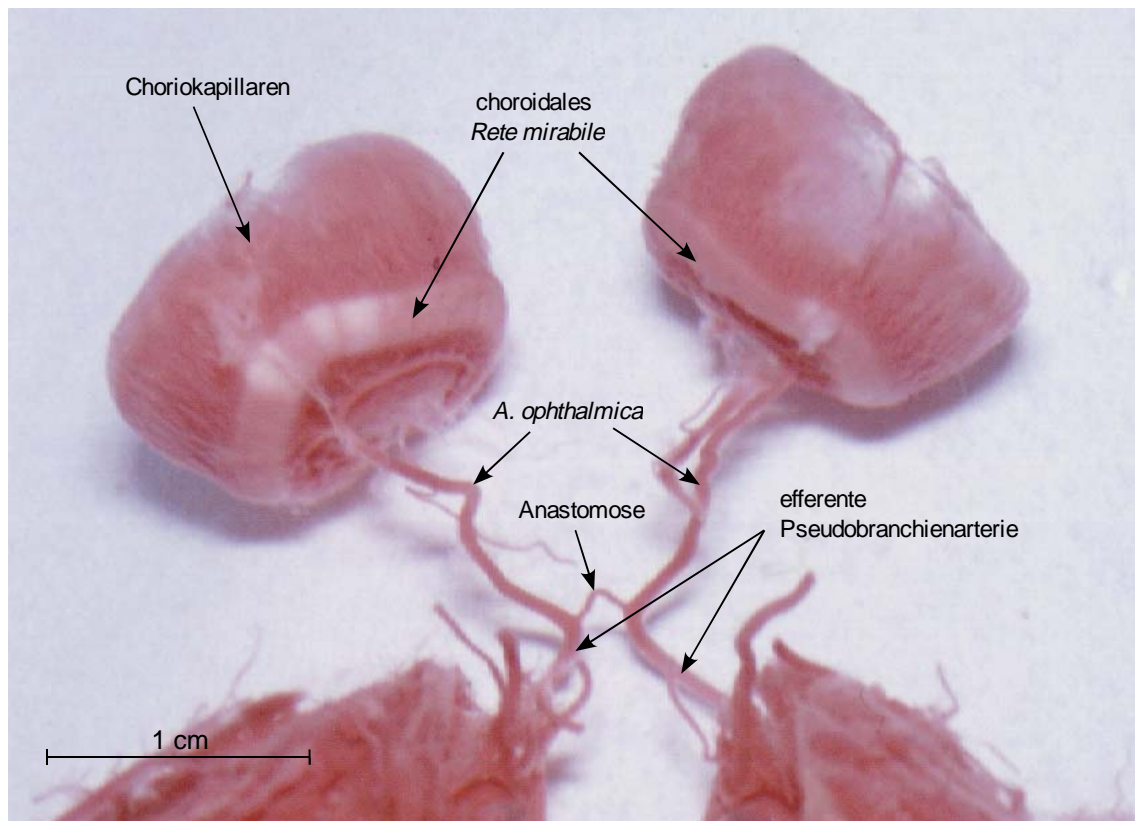


Abbildung 8: Gefäßausguss einer Forelle - Bereich der Kiemen und Augen von dorsal.

Die efferenten Arterien der Pseudobranchien der beiden Körperseiten sind über eine dünne Anastomose miteinander verbunden und führen dann als A. ophthalmica weiter zum Auge, wo sie die einzige Gefäßversorgung des choroidalen Rete mirabile darstellen.

4.3 Aufbau der Retina

Die Retina der Regenbogenforelle weist die für Wirbeltiere übliche Abfolge der Zellschichten auf (OYSTER, 1999; s. Abbildung 9, S. 49). Auf das außen gelegene Pigmentepithel (PE) folgen die lichtempfindlichen Zellfortsätze der Photorezeptorzellen (PRL = photoreceptor layer). Durch eine deutliche Linie (= äußere limitierende Membran: OLM = outer limiting membrane) abgetrennt folgt dann die äußere Körnerschicht (ONL = outer nuclear layer), die aus den Zellkörper der Photorezeptorzellen besteht. Die OLM ist in Schnitten der Retina meist als markante Grenze zwischen den PRL und der ONL zu erkennen, obwohl hier histologisch keine Membran im Gewebe vorliegt. Die relativ scharf erscheinende Trennlinie kommt vielmehr durch die Müller'schen Stützzellen der Retina zustande, die an dieser Linie *tight junctions* mit den Photorezeptoren bilden. Es schließen sich die äußere plexiforme Schicht (Dendrite der Photorezeptorzellen zur nächsten Zellschicht: OPL = outer plexiform layer), die innere Körnerschicht (Zellkörper der Horizontal-, Bipolar- und Amakrin-Zellen: INL = inner nuclear layer), die innere plexiforme Schicht (Dendrite der Ganglionzellen: IPL = inner plexiform layer), die Ganglionzellschicht (Zellkörper der Ganglionzellen: GCL = ganglion cell layer) und letztendlich die Axonschicht (Axone der Ganglionzellen, die durch den Sehnerv ins Gehirn verlaufen: NFL = nerve fiber layer) an. Die innere limitierende Membran (ILM) bildet die innere Begrenzung der Retina zum Glaskörper.

Tabelle 1: Stärke der einzelnen Retinaschichten in μm und Gesamtdicke.

($N = 3$ [Anzahl Forellen], $n \geq 29$ [Einzelmessungen pro Retinaschicht])

PE+PRL: pigment epithelium + photoreceptor layer, ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, INL: inner nuclear layer, IPL: inner plexiform layer, GCL+NFL: ganglion cell layer + nerve fiber layer

	PE+PRL	ONL	OPL	INL	IPL	GCL+NFL
	(μm)					
\bar{x}	146	42	26	52	58	83
S.E.M.	12,2	0,8	1,7	1,5	0,6	6,8
Σ	146	188	213	266	323	407
Fehler						14,2

Die Stärke der Retina der Regenbogenforelle betrug $407 \mu\text{m}$ (s. Tabelle 1, S. 49). Stärkste Schicht mit $146 \mu\text{m}$ war der Bereich des PE und der Photorezeptoren. Diese Schicht entspricht der Distanz von der Bruch'schen Membran bis zur OLM. Eine getrennte Messung der Dicke von PE und PRL war wegen der Einbettung der lichtempfindlichen Bereiche der Sinneszellen in das PE und der Verteilung des Pigments nicht möglich (s. Abbildung 9, S. 49). Der vergleichsweise hohe Standardfehler der Dicke von PE und PRL wird durch die unterschiedliche Stärke dieser Schicht von der Peripherie (*Ora serrata*) zu zentralen Bereichen der Retina (posteriorer Augenpol) verursacht. In den Randbereichen ist die PRL deutlich dünner als am posterioren Augenpol.

Die nächsten vier Schichten der Retina, ONL, OPL, INL und IPL machen ca. 44% der Dicke der Retina aus. Sie weisen über die gesamte Retina eine uniforme Stärke auf.

Der Bereich der GCL und NFL hatte eine Stärke von $83 \mu\text{m}$. Auch hier weist der hohe Standardfehler auf eine ungleichmäßige Stärke der Schichten in der Retina hin. Im Bereich der *Ora serrata* ist insbesondere die NFL wegen der geringen Anzahl an Axone noch sehr

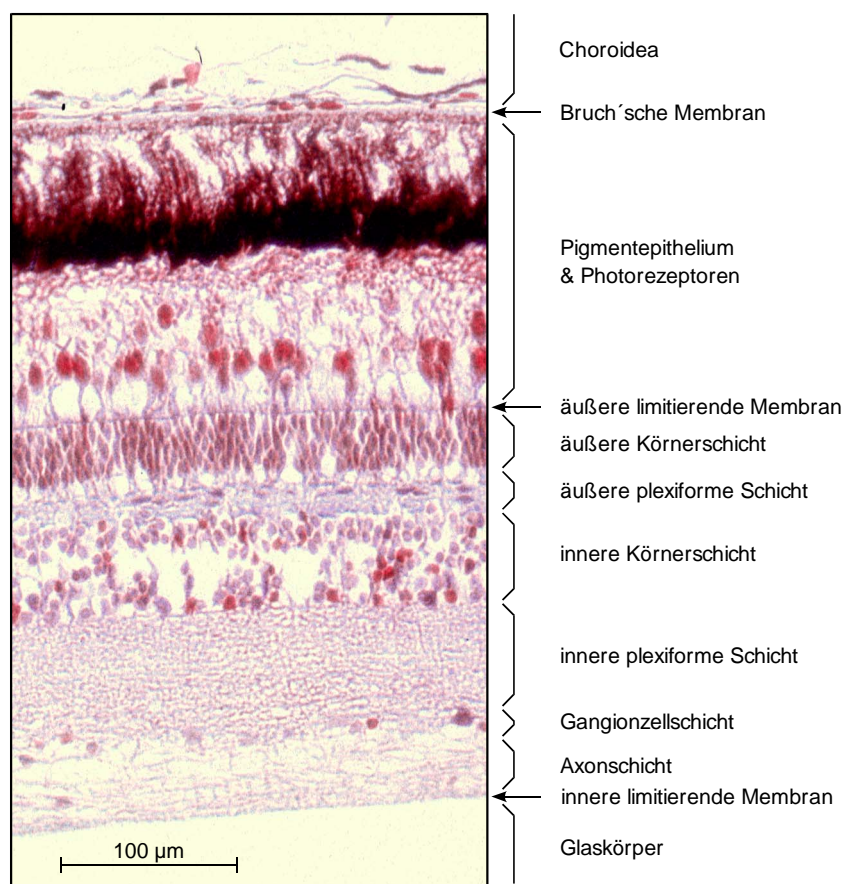


Abbildung 9: Querschnitt durch die Retina der Regenbogenforelle. Mikroskopaufnahme.

dünn. Ihre Stärke nimmt zum posterioren Augenpol hin markant zu und ist direkt neben dem Eintritt des Sehnervs ins Auge am größten.

Bei der Messung der Dicke der Retina wurde eine Schrumpfung des Gewebes durch die Einbettung in Paraffin auf 74% der ursprünglichen Größe berücksichtigt (WEIBEL, 1979).

4.4 In vivo – Versuche: Systemische Parameter

Die Kontrolle des pH-Wertes von arteriellem Blut aus der DA vor der Narkose und dem eigentlichen Experiment ergab einen Mittelwert von 7,89 (s. Tabelle 2, S. 50). Durch künstliche Ventilation der Fische wurde eine geringfügige, aber signifikante Erhöhung des arteriellen Plasma-pH-Wertes auf 8,02 verursacht (paired t-Test, $P < 0,001$).

Tabelle 2: Systemische Parameter vor und während der in vivo – Experimente.

Der arterielle pH und PO_2 wurden vor einem Experiment an unbetäubten Forellen überprüft. Während der Experimente wurden der arterielle pH- und PO_2 -Wert durch wiederholte Entnahme von Blutproben kontrolliert und Blutdruck sowie Herzschlagamplitude und -frequenz wurden kontinuierlich aufgezeichnet.

**: signifikanter Unterschied zum arteriellen pH-Wert unbetäubter Forellen*

	pH	PO_2 (Torr)	Blutdruck (Torr)	Herzschlag	
				Amplitude (Torr)	Frequenz (Hz)
Messwerte von unbetäubten Forellen direkt vor dem Experiment	$7,89 \pm 0,11$ n = 41	102 ± 19 n = 39	-	-	-
Messwerte von betäubten, künstlich ventilierten Forellen während des Experiments	$8,02^* \pm 0,12$ n = 41	99 ± 21 n = 38	$28 \pm 6,8$ n = 52	$2,6 \pm 1,52$ n = 39	$1,23 \pm 0,16$ n = 51

Der PO_2 in Blutproben aus der DA betrug vor der Betäubung der Forellen 102 Torr und änderte sich während der künstlichen Ventilation der Forellen nicht signifikant (s. Tabelle 2).

Der Blutdruck lag während der Durchführung der Experimente bei den künstlich ventilierten Forellen bei 28 Torr. Die Herzschlagamplitude betrug 2,6 Torr.

Die Herzschlagfrequenz der betäubten Forellen während der Versuche betrug 1,23 Hz (s. Tabelle 2). Während des Verlaufs eines Versuches konnte in der Regel eine kontinuierliche leichte Abnahme der Herzschlagfrequenz beobachtet werden.

In einigen Fällen konnten während der Experimente Änderung des Blutdrucks ausgelöst durch eine Veränderung der Betäubungsmittelkonzentration und auch durch eine Änderung des PCO_2 im Ventilationswassers beobachtet werden. Die Injektion von Pancuronium® hatte meist einen kurzzeitigen Anstieg des Blutdrucks zur Folge. Ein Beispiel der kontinuierlichen Messung der systemischen Parameter ist in Abbildung 10, S. 51 dargestellt:

Die Aufzeichnung von Blutdruck, Herzschlagfrequenz und -amplitude startete bei 54 min mit dem Anschluss des Drucksensors an den Aorten-Katheter.

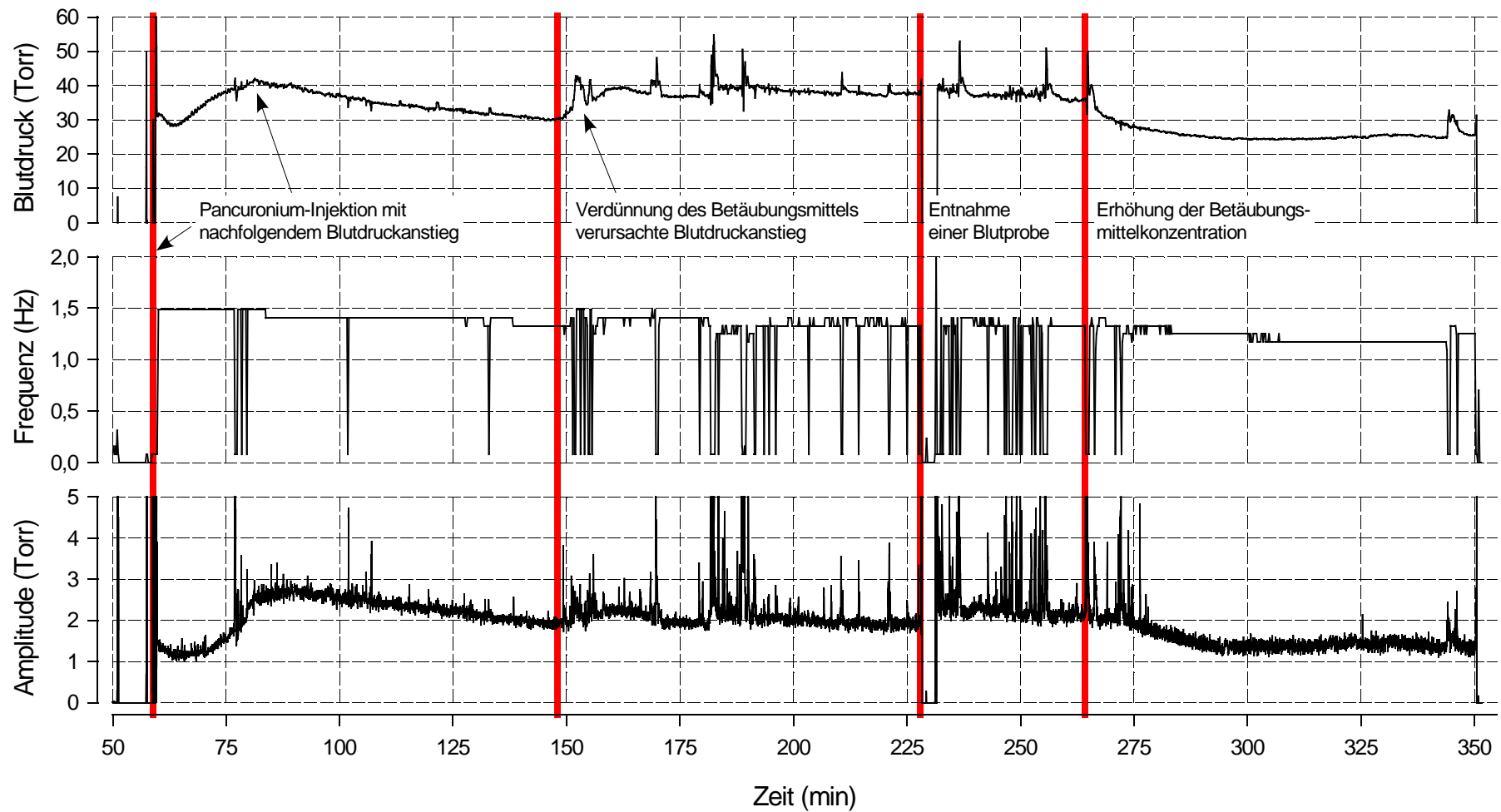


Abbildung 10: Blutdruck-, Herzfrequenz- und -amplitudenverlauf während eines Experiments an einer narkotisierten, künstlich ventilierten Forelle.

Kurz vor dem Anschluss des Katheters für die Druckmessung wurden zur Muskelrelaxation 30 μl Pancuronium® injiziert, die den folgenden Anstieg des Blutdrucks bis zur ca. 80. min verursachten. Auch in der Amplitude des Herzschlags ist ein dem Blutdruck parallel verlaufender Anstieg zu verzeichnen. Die Herzschlagfrequenz betrug zu Beginn der Messung 1,5 Hz.

Nach der Beendigung der chirurgischen Eingriffe wurde bei ca. 145 min das Betäubungsmittel im Ventilationswasser verdünnt. Dies hatte einen Anstieg des Blutdrucks von ca. 30 auf 40 Torr zur Folge. Im weiteren Verlauf blieb der Blutdruck bei ca. 38 Torr konstant. Bei der Herzschlagamplitude und auch der Herzschlagfrequenz ist zum gleichen Zeitpunkt ebenfalls ein leichter Anstieg der Werte zu beobachten, wobei beide Parameter schnell wieder auf die Werte vor der Betäubungsmittelverdünnung zurückgingen.

Von 228 bis 232 min wurde die Messung aller drei Parameter für die Entnahme einer Blutprobe unterbrochen. Bei 265 min wurden dem Ventilationswasser wieder 40 mg l^{-1} MS222 für weitere Präparationen zugegeben. Die anschließende Abnahme des Blutdrucks um ca. 10 Torr sowie die Verringerung der Herzschlagamplitude sind deutlich zu erkennen. Bei 350 min wurde das Experiment beendet.

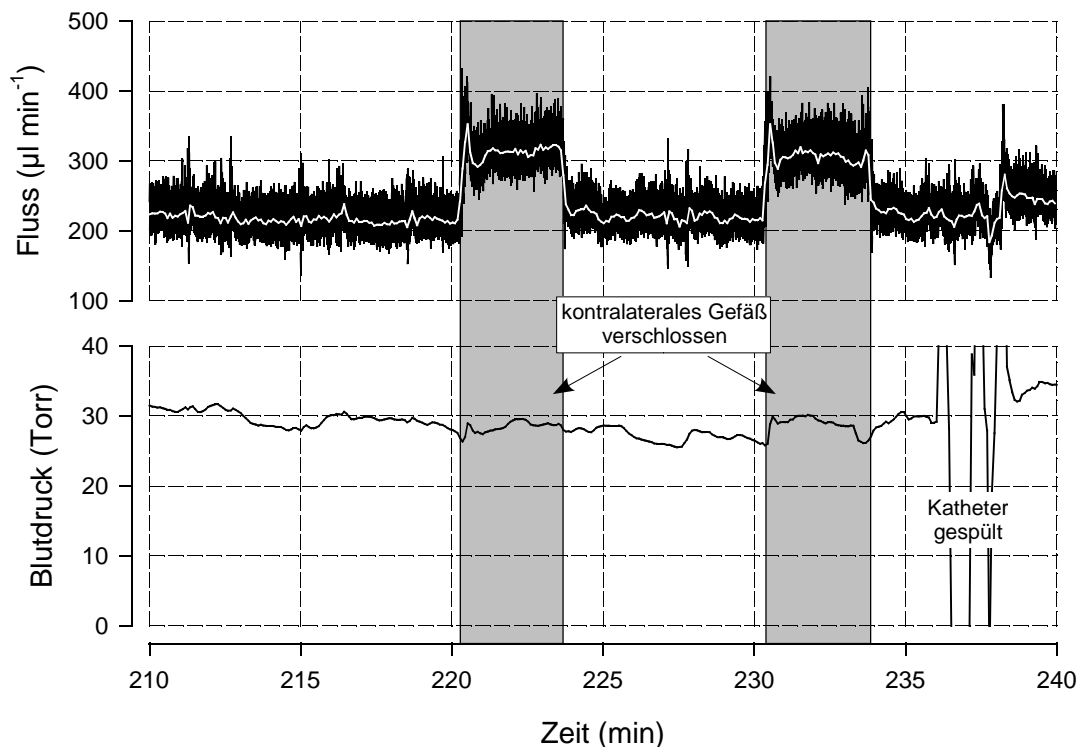


Abbildung 11: Beispiel der Flussmessung in der afferenten Arterie der Pseudobranchie und der parallelen Messung des Blutdrucks.

Es wurde die Flussrate (obere Abbildung) sowie der Blutdruck (untere Abbildung) gegen die Zeit (Versuchsverlauf) aufgetragen.

Flussrate: schwarze Linie: Auflösung von 5 Hz, weiße Linie: Blockmittelwerte von jeweils 10 Werten (0,5 Hz). Die Perioden des Verschlusses des kontralateralen Gefäßes sind grau hinterlegt. Die Blutdruckschwankungen zwischen 235 und 240 min wurden durch Spülen des Katheters verursacht.

4.5 Flussrate in der afferenten Arterie der Pseudobranchie


Der Blutfluss in der aPA betrug $216 \mu\text{l min}^{-1}$ (S.D. = $80 \mu\text{l min}^{-1}$, $n = 8$), auf das Gewicht der Forellen bezogen $745 \mu\text{l min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ (S.D. = $282 \mu\text{l min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$, $n = 8$). Durch Verschluss des kontralateralen Gefäßes stieg der Blutfluss im ipsilateralen Gefäß signifikant (paired t-Test, $P < 0,001$) auf 135% des ursprünglichen Flusses an (s. Abbildung 11, S. 52 und Tabelle 3).

Während der Eichung des Flusssignals, nach durchgeführter Flussmessung, wurde der Perfusionsdruck konstant gehalten ($\bar{x} = 31,9$ Torr, S.D. = $5,8$ Torr, $n = 8$, s. Abbildung 12).

Tabelle 3: Blutfluss in der afferenten Arterie der Pseudobranchie.

Flusswerte in $\mu\text{l min}^{-1}$ und $\mu\text{l min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$, Zusätzlich ist der während der Flussmessung aufgezeichnete Blutdruck angegeben. Die bei Verschluss des kontralateralen Gefäßes gemessenen Werte sind grau unterlegt.

	Perfusion				Blutdruck	
	$(\mu\text{l min}^{-1})$	$(\mu\text{l min}^{-1} \text{ kg}^{-1})$	$(\mu\text{l min}^{-1})$	$(\mu\text{l min}^{-1} \text{ kg}^{-1})$	(Torr)	(Torr)
\bar{x}	216	294	746	1015	32,8	33,6
S.D.	80	117	282	413	5,9	6,0
n	8	8	8	8	8	8
	100%	135%	100%	135%		

 kontralaterales Gefäß verschlossen

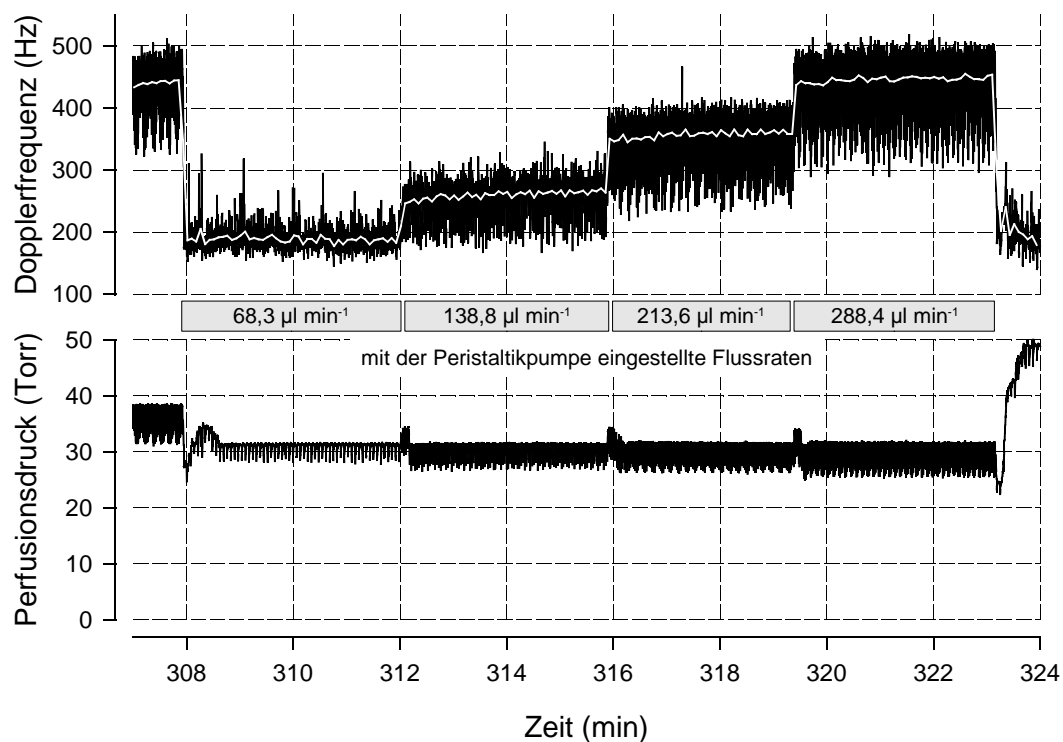


Abbildung 12: Eichung des Doppler-Flowmeters.

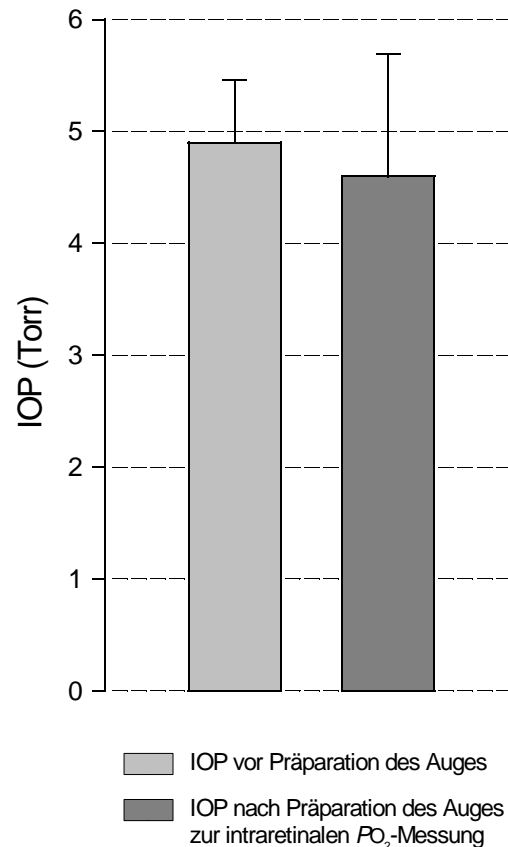
Oben: Dopplerfrequenz, unten: Perfusionsdruck bei vier mit der Peristaltikpumpe eingestellten Flussraten. Datenerfassung 5 Hz; weiße Linie: Blockmittelwerte von jeweils 10 Werten (0,5 Hz).

Zwischen den gemessenen Blutdrücken bei offenem und geschlossenem kontralateralen Gefäß und dem Perforationsdruck bei der Eichung des Flusssignals (s. Tabelle 3, S. 53) bestand kein statistisch signifikanter Unterschied (One-way-ANOVA).

Es konnte keine Korrelation zwischen dem Gewicht der Forellen und der gemessenen Flussrate nachgewiesen werden (Pearson Product Moment Correlation, $P > 0,05$)

4.6 Augeninnendruck

Der Augeninnendruck (s. Abbildung 13) betrug bei künstlich ventilierten Forellen, gemessen in der vorderen Augenkammer, 4,9 Torr (S.D. = 0,56 Torr, $n = 8$). Durch die Präparation des Auges zur intraretinalen PO_2 -Messung wurde keine statistisch signifikante Änderung des Augeninnendrucks verursacht (paired t-Test, $P = 0,588$): nach Punktion der Cornea, Einsetzen der Führungskanüle und Einführen der Sauerstoffmikroelektrode betrug der Augeninnendruck 4,6 Torr (S.D. = 1,09 Torr, $n = 8$). Erst das Herausnehmen der Sauerstoffmikroelektrode und insbesondere die Entfernung der Führungskanüle führte in den meisten Fällen zu einer sofortigen, deutlichen Verringerung des Augeninnendrucks.



4.7 Elektroretinogramm

Die vom Auge der Forelle abgeleiteten Elektroretinogramme (ERG) wiesen die bei Wirbeltieren für ERGs

üblichen Elemente auf (BROWN, 1968): a-Welle, b-Welle und c-Welle (s. Abbildung 14, S. 55). Direkt nach dem Reiz erschien zuerst die negative a-Welle, die von der etwas später auftretenden, positiven b-Welle überlagert wurde. Deutlich später konnte dann in einigen Fällen noch eine positive c-Welle beobachtet werden, welche allerdings durch den messtechnisch notwendigen Hochpass in der Schaltung für die ERG-Aufzeichnung (s. 3.3.2.5, S. 29) in ihrer Amplitude schon deutlich vermindert sein konnte.

Bei aufeinander folgenden Experimenten konnten nicht immer in ihrem Gesamterscheinungsbild übereinstimmende ERGs beobachtet werden (s. Abbildung 15, S. 56). Ein „übliches“ ERG, wie es in den meisten Fällen auftrat, ist in Abbildung 14, S. 55 und Abbildung 15, 3, S. 56 dargestellt: auf die a- und b-Welle folgte in der Regel nur eine schwach ausgeprägte c-Welle. Eine stark ausgeprägte c-Welle (s. Abbildung 15, 1 und 2, S. 56) trat nur sehr selten auf. Bis auf ganz wenige Ausnahmen (s. Abbildung 15, 1, S. 56) war die

Abbildung 13: Augeninnendruck vor und nach Präparation des Auges für die intraretinale PO_2 -Messung.

Amplitude der c-Welle immer geringer als die der b-Welle. Von der „normalen“ Form abweichende ERGs konnten nur in Einzelfällen beobachtet werden. Als Beispiel ist in Abbildung 15, 4, S. 56 ein ERG ohne b-Welle dargestellt.

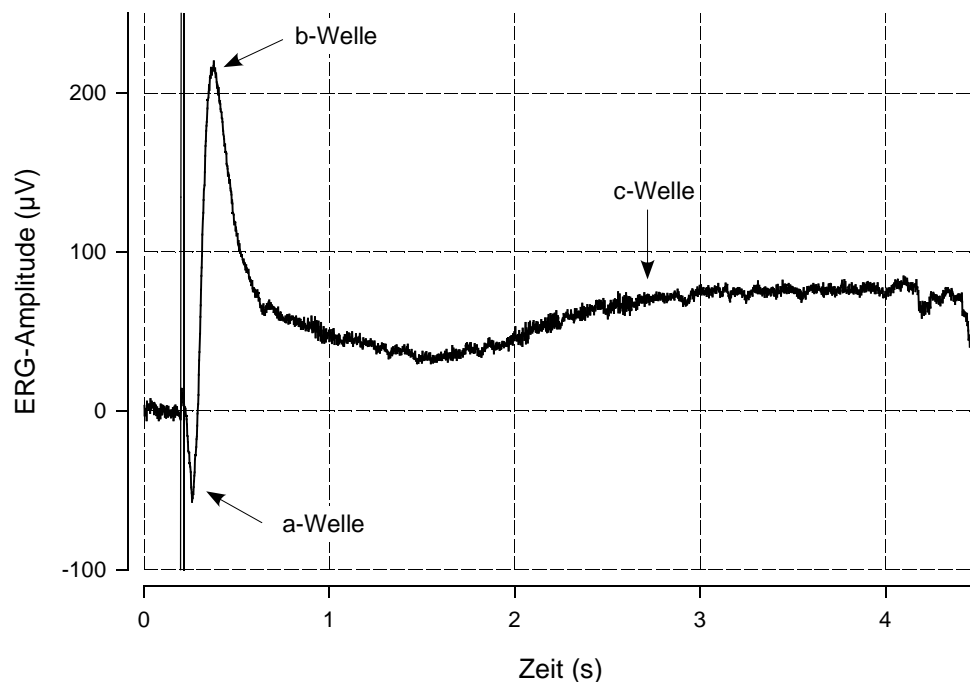


Abbildung 14: Elektretinogramm abgeleitet vom Forellenaue.

Es wurde die Amplitude des ERGs gegen die Zeit aufgetragen. Die senkrechten Linien bei ca. 200 ms markieren den Ein- und Ausschaltzeitpunkt der Leuchtdiode.

Die Abhängigkeiten der Positionen der a- und b-Welle sowie der Amplituden der beiden Wellen von der Reizdauer und -intensität sind in Abbildung 16, S. 57 dargestellt:

a-Welle

Eine zunehmende Reizintensität führte zu einer Verkürzung der Verzögerung der a-Welle. Bei geringen Reizintensitäten betrug die Verzögerung 60 ms, bei der höchsten Reizintensität 42 ms. Die Position des Maximums war dabei unabhängig von der Reizdauer.

Die Amplitude der a-Welle stieg mit zunehmender Reizdauer und -intensität an. Bei den eingesetzten Werten konnte kein Plateau erreicht werden. Eine maximale Reizdauer von 10,5 ms und Reizintensität von 50 cd resultierte in einer Amplitude von -150 µV. Da die Amplitude der a-Welle bei den drei eingesetzten Reizlängen von 0,64, 4,31 und 10,5 ms kontinuierlich anstieg, ist zu erwarten, dass bei einer weiteren Verlängerung des Reizes über die 10,5 ms hinaus auch die Amplitude der a-Welle weiter steigt. Bei den geringeren Reizintensitäten war die Amplitude der a-Welle generell so niedrig, dass der Peak im Hintergrundrauschen unterging. Die hohen Standardabweichungen sind bei diesen Intensitäten daher auf die automatische Peakerkennung zurückzuführen, die in diesen Fällen den Peak der a-Welle nicht aus dem Hintergrundrauschen auflösen konnte. Die Verzögerung der a-Welle wurde daher, bei praktisch nicht vorhandenem Peak, innerhalb des Analysebereiches willkürlich bestimmt.

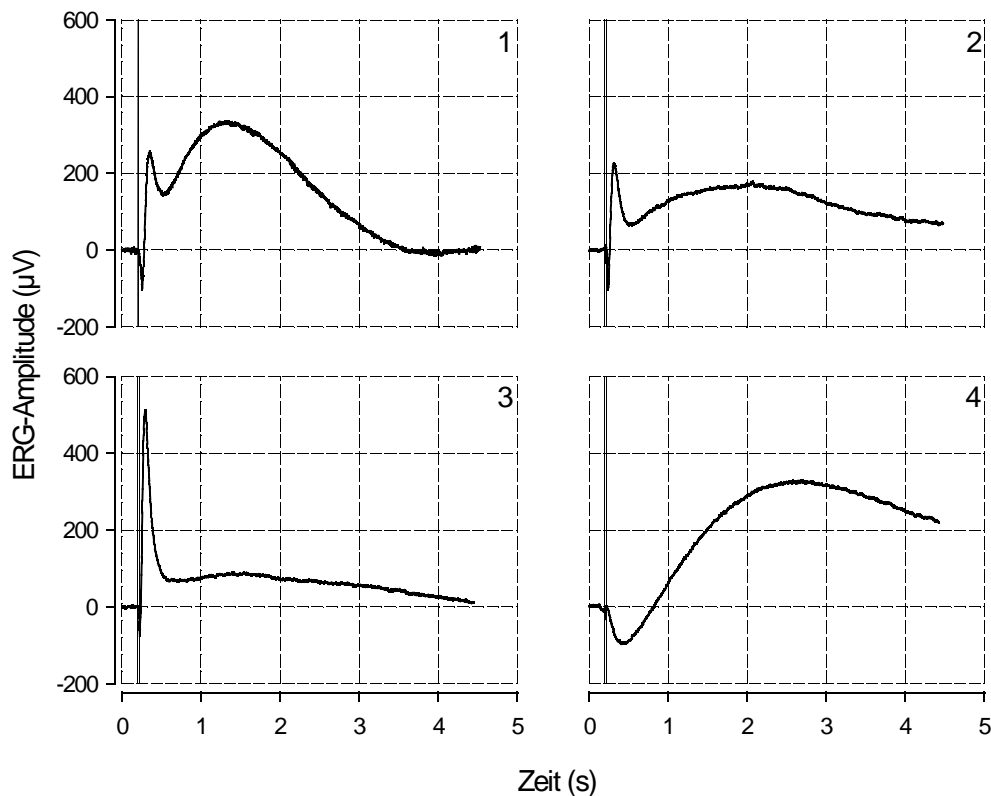


Abbildung 15: Bei verschiedenen Forellen abgeleitete Elektroretinogramme.

1: mit sehr großer c-Welle; 2: mit deutlicher c-Welle; 3: häufigste Form mit nur schwach ausgeprägter c-Welle; 4: „anormales“ ERG mit verzögerter a-Welle, fehlender b-Welle und großer c-Welle. Die senkrechte Linie bei ca. 200 ms markiert den Zeitpunkt der Reizauslösung.

b-Welle

Auch bei der b-Welle war mit zunehmender Reizintensität eine Reduktion der Verzögerung zu beobachten. Gleichzeitig resultierte auch die Erhöhung der Reizdauer in einer Verschiebung des b-Wellen-Maximums. Betrug die Verzögerung der b-Welle bei geringen Reizintensitäten und geringer Reizdauer ca. 200 ms, so trat das Maximum bei hoher Reizintensität und -dauer schon nach 120 ms auf. Die Änderung der Verzögerung der b-Welle um ca. 20 ms war bei einer Verlängerung des Reizes von 0,64 auf 4,3 ms noch sehr deutlich, während eine weitere Reizverlängerung auf 10,5 ms nur eine geringe Verlagerung des Maximums um ca. 5 ms verursachte. Die minimale Verzögerung scheint daher fast erreicht worden zu sein.

Eine ähnliche Auswirkung hatte die Reizdauer und -intensität auf die Amplitude der b-Welle. Geringe Intensität und Dauer resultierten in einer Amplitude der b-Welle von ca. 100 µV, während bei hoher Intensität und Dauer Amplituden von ca. 500 µV gemessen werden konnten.

Anders als bei der a-Welle war für die Amplitude der b-Welle das Erreichen eines Plateau-Wertes zu erkennen. Bei einer Reizdauer von 4,3 und 10,5 ms war bei Erhöhung der Reizintensität von 1,55 auf 50 cd keine weitere Zunahme der Amplitude der b-Welle zu verzeichnen. Ebenso führte die Verlängerung des Reizes von 4,3 auf 10,5 ms bei den Intensitäten 1,6 und 50 cd nicht zu einem weiteren Anstieg der Amplitude.

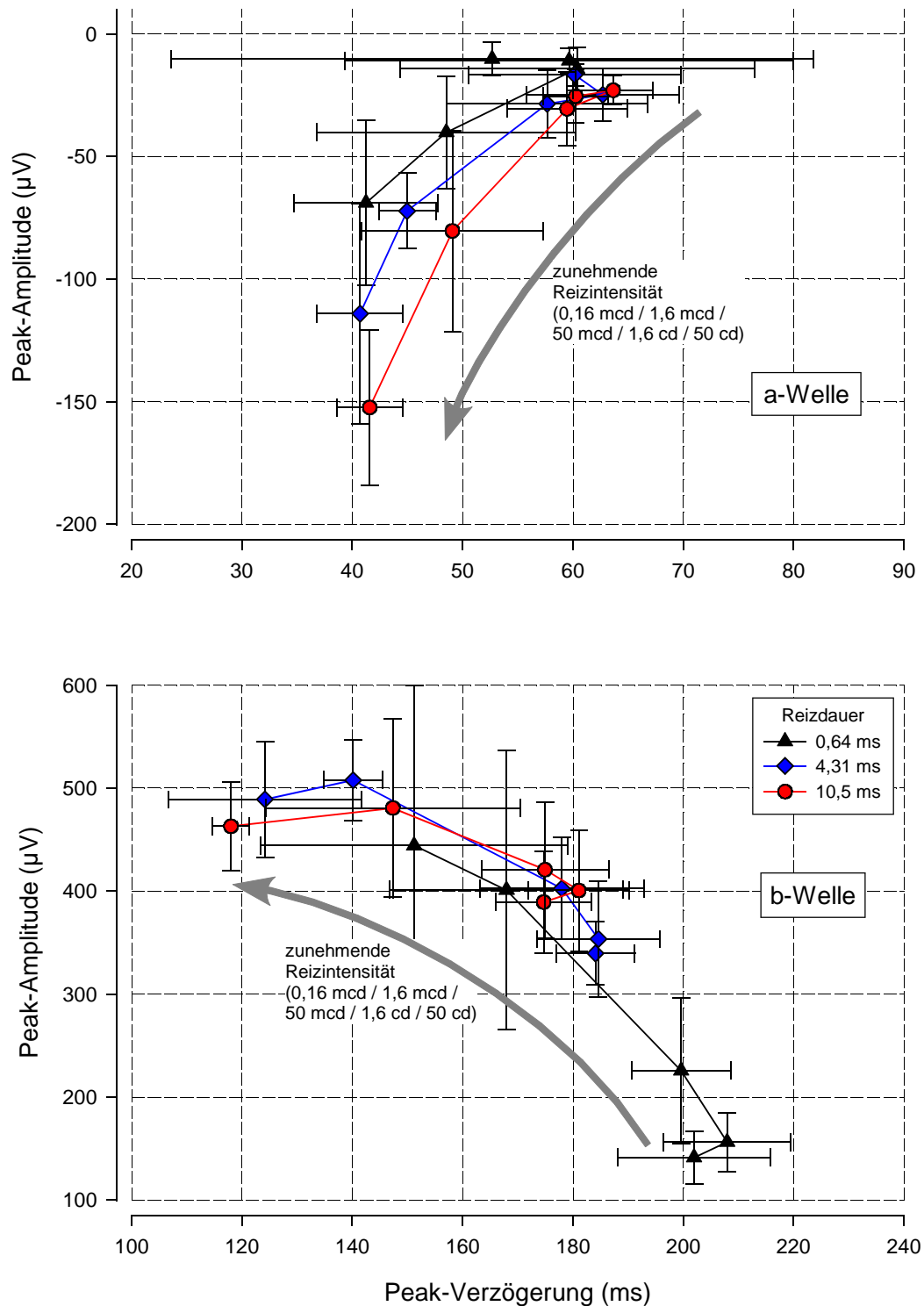


Abbildung 16: Abhängigkeit der Peak-Amplitude und -Verzögerung der a- und b-Welle von der Reizdauer und -intensität.

Die Erhöhung der Reizdauer und -intensität führte bei der a-Welle zu dem Erreichen einer minimalen Verzögerung, die maximale Amplitude konnte aber nicht erreicht werden. Bei der b-Welle stellte sich eine maximale Amplitude ein, der Endwert der Verzögerung wurde aber wohl nicht ganz erreicht.

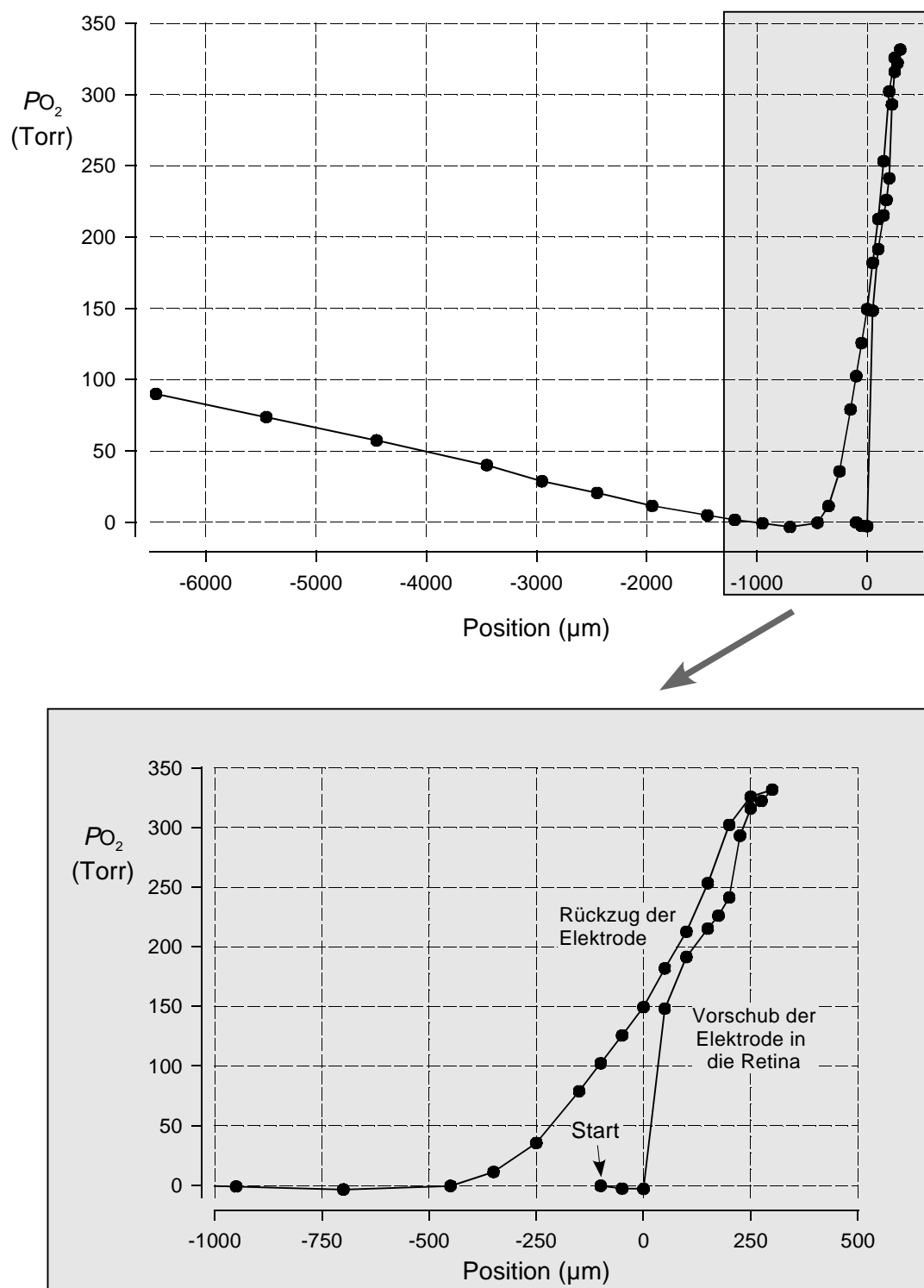


Abbildung 17: Intraretinale Sauerstoffmessung im geöffneten Auge. Oben: komplettes Profil; unten: Teilansicht des Profils.

Es wird der PO_2 in Abhängigkeit von der Position der Elektrode im Auge dargestellt. Die Elektrode wurde zu Beginn in die Nähe der Retinaoberfläche positioniert und dann in die Retina vorgeschoben. Nach Erreichen eines Maximalwertes wurde die Elektrode wieder bis in den vorderen Augenbereich zurückgezogen.

4.8 Intraretinaler Sauerstoffpartialdruck und Elektroretinogramm

4.8.1 Retinales Sauerstoffprofil

Die Messungen des PO_2 im Bereich der Retina ergaben folgendes Bild:

- der niedrigste PO_2 wurde generell direkt an der ILM (Grenze zwischen Glaskörper und Retina) der Retina gemessen. Dies konnte insbesondere bei den Messungen am geöffneten Auge, bei entfernter Cornea und Linse, beobachtet werden (s. Abbildung 17, S. 58). Auch bei den Messungen, bei denen die genaue Position der Elektrode nicht mikroskopisch kontrolliert werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass sich die Elektrodenspitze bei der Messung des niedrigsten PO_2 an der Oberfläche der Retina befand.
- beim Vorschieben der Sauerstoffmikroelektrode in die Retina stieg der PO_2 schnell an und erreichte in fast allen Fällen Werte, die weit über dem im arteriellen Blut gemessenen PO_2 lagen (s. Abbildung 17, S. 58, Abbildung 18 und Abbildung 19, S. 60).
- von einer bestimmten Position in der Retina ab stieg der PO_2 nicht mehr weiter an, sondern blieb bei weiterem Vorschub der Elektrode konstant oder fiel leicht ab. Die Position des höchsten PO_2 wurde mit der äußeren Oberfläche (Bruch'sche Membran, Grenze zwischen Pigmentepithel und Choroidea) der Retina gleichgesetzt.
- die Profile, die durch Vorschub und Rückzug der Elektrode gemessen wurden, waren nur selten deckungsgleich.

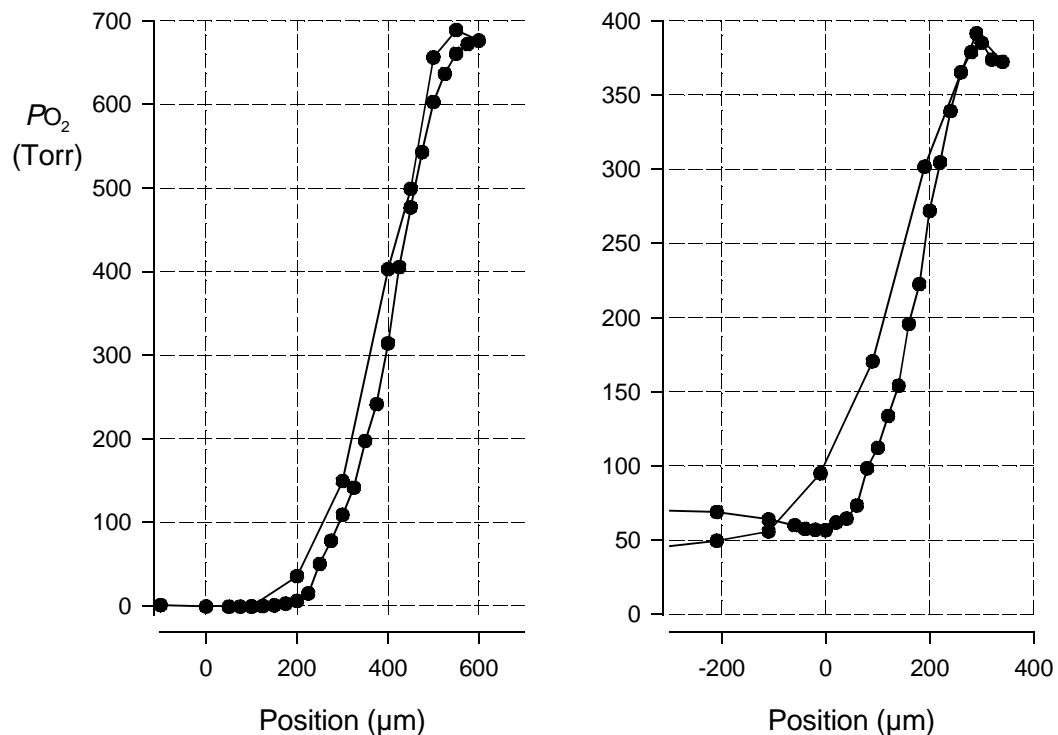


Abbildung 18: Sauerstoffpartialdruck in der Retina von Forellen.

Es wurde der in der Retina der Forellen gemessene PO_2 gegen die Position der Sauerstoffelektrode aufgetragen. Die Nullposition entsprach dabei der inneren Oberfläche der Retina bzw. der Position mit dem niedrigsten gemessenen PO_2 .

- Bei weiterem Rückzug der Elektrode von der inneren Oberfläche der Retina blieb der PO_2 entweder sehr niedrig oder stieg bis zur Oberfläche des Auges auf den Partialdruck der Luft an (s. Abbildung 17, S. 58).

Der mittlere maximale PO_2 in der Retina der Forelle betrug 382 Torr (S.D. = 143 Torr, $n = 23$, Max = 689, Min = 174 Torr). An der inneren Oberfläche der Retina wurde ein PO_2 von 10 Torr (S.D. = 21 Torr, $n = 23$, Max = 64, Min = -14 Torr) gemessen. Die Vorschubstrecke vom minimalen zum maximalen PO_2 in der Retina betrug im Durchschnitt 433 μm (S.D. = 106 μm , $n = 23$, Max = 650, Min = 290 μm).

In Abbildung 18, S. 59 und Abbildung 19 sind einige Beispiel-Profile der Sauerstoffmessung in der Retina von Forellen dargestellt.

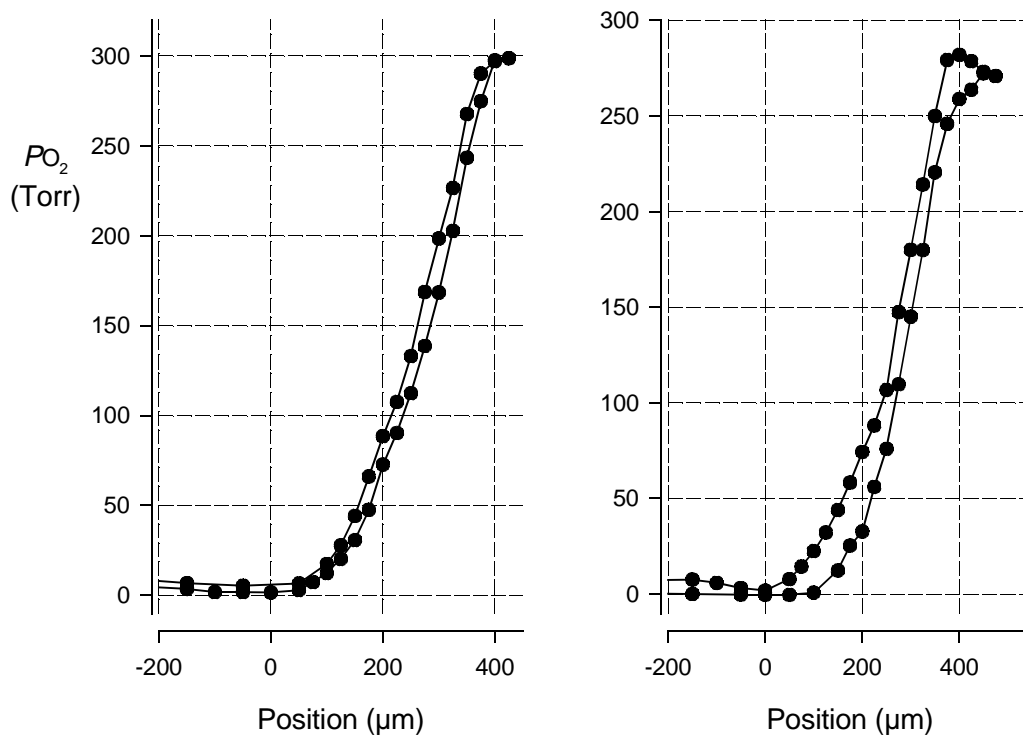


Abbildung 19: Sauerstoffpartialdruck in der Retina von Forellen.

Wie in Abbildung 18, S. 59 wurde der in der Retina der Forellen gemessene PO_2 gegen die Position der Sauerstoffelektrode aufgetragen. Die Nullposition entsprach dabei der inneren Oberfläche der Retina bzw. der Position mit dem niedrigsten gemessenen PO_2 .

4.8.2 Elektoretinogramm bei intraretinaler Sauerstoffmessung

Zur Aufzeichnung der ERGs während der intraretinalen PO_2 – Messung wurde jeweils ein Reiz mit maximaler Intensität von 50 cd und einer Dauer von 10,5 ms gesetzt.

Die Verzögerung der a-Welle zur Reizauslösung betrug im Mittel 35 ms, die Amplitude -60 μV . Die b-Welle erschien erst mit einer Verzögerung von 115 ms, während eine mittlere Amplitude von 249 μV gemessen wurde (s. Tabelle 4, S. 61).

Die während der Durchführung eines Experiments aufgezeichneten ERGs änderten sich über den jeweiligen Versuchszeitraum nur unwesentlich (Bsp. s. Abbildung 20, S. 62 und Abbildung 21, S. 63).

In Abbildung 21 auf S. 63 wird der Verlauf der Dunkeladaptation durch die Aufzeichnung einiger ERGs nach der Verdunklung des Raumes deutlich. Das erste ERG, kurz vor der Verdunklung aufgezeichnet, wies eine sehr geringe Amplitude für die a- und b-Welle auf. Die zeitliche Verzögerung der a-Welle ist ebenfalls sehr gering. Über die nächsten vier ERGs konnte bei der a-Welle eine Zunahme der Amplitude und eine zunehmende Verzögerung beobachtet werden. Bei den Werten der b-Welle sind die Veränderung nicht so deutlich. Nach 44 min hatten sich bezüglich der Amplitude und Verzögerung dann Werte eingestellt, die während des weiteren Versuchsverlaufs konstant blieben.

Tabelle 4: Verzögerungs- und Amplitudenwerte der während der intraretinalen Sauerstoffmessung abgeleiteten ERGs.

	Verzögerung (ms)	Amplitude (μV)
	n = 12	n = 11
a-Welle	35 \pm 13,7 Max: 59 / Min: 17	-60 \pm 24,6 Max: -103 / Min: -36
b-Welle	115 \pm 29,9 Max: 166 / Min: 76	249 \pm 63,1 Max: 390 / Min: 158

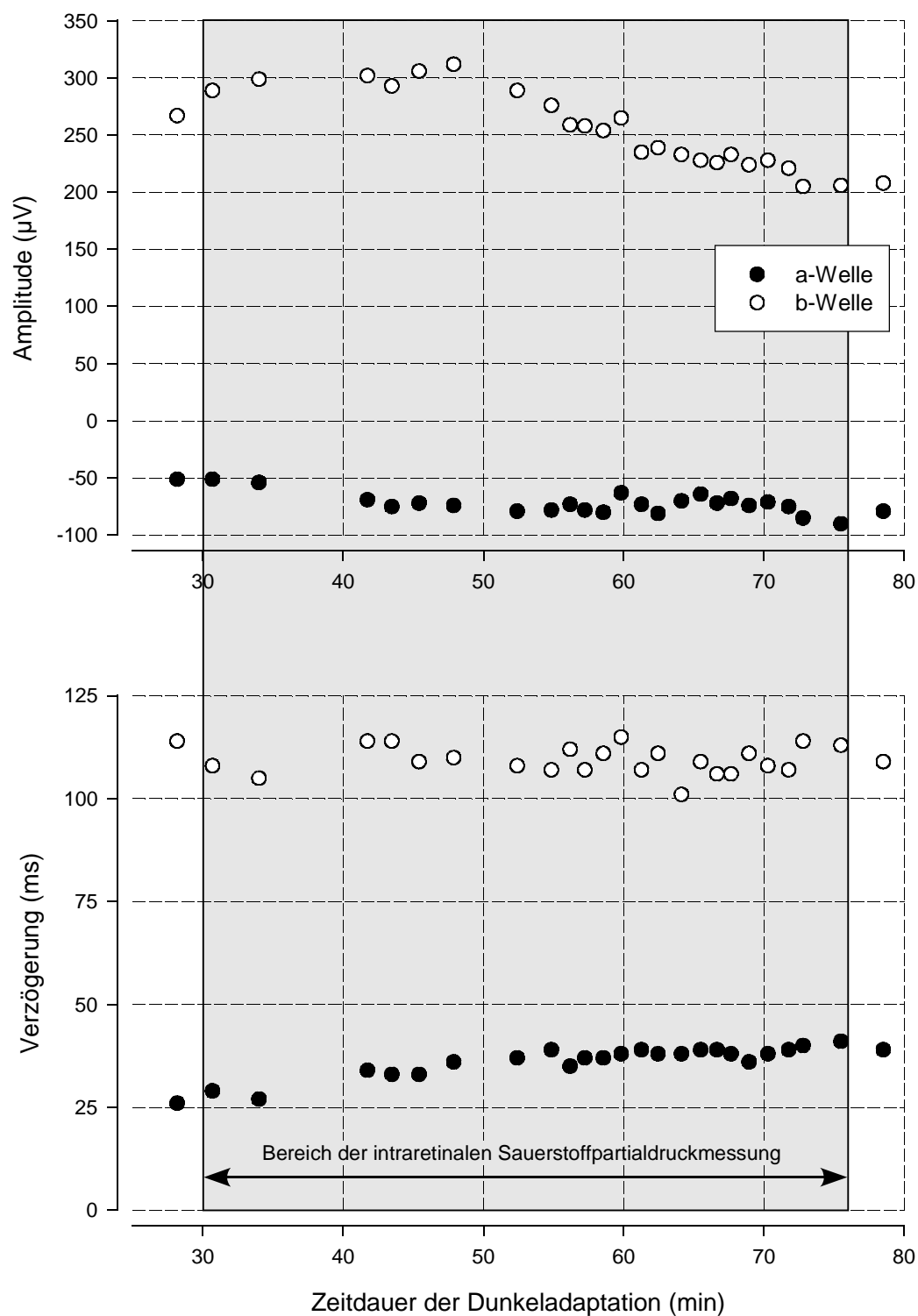


Abbildung 20: ERG-Daten während der intraretinalen Sauerstoffpartialdruckmessung.

Oben: Die Amplitude der a- und b-Welle wurde gegen die Zeit (Zeitdauer der Dunkeladaptation) aufgetragen.

Unten: Auftragung der Verzögerung der a- und b-Welle nach Reizauslösung gegen die Zeitdauer der Dunkeladaptation.

Der Bereich der intraretinalen PO_2 -Messung (O_2 -Profil s. Abbildung 19, S. 60, linke Grafik) wurde grau hinterlegt.

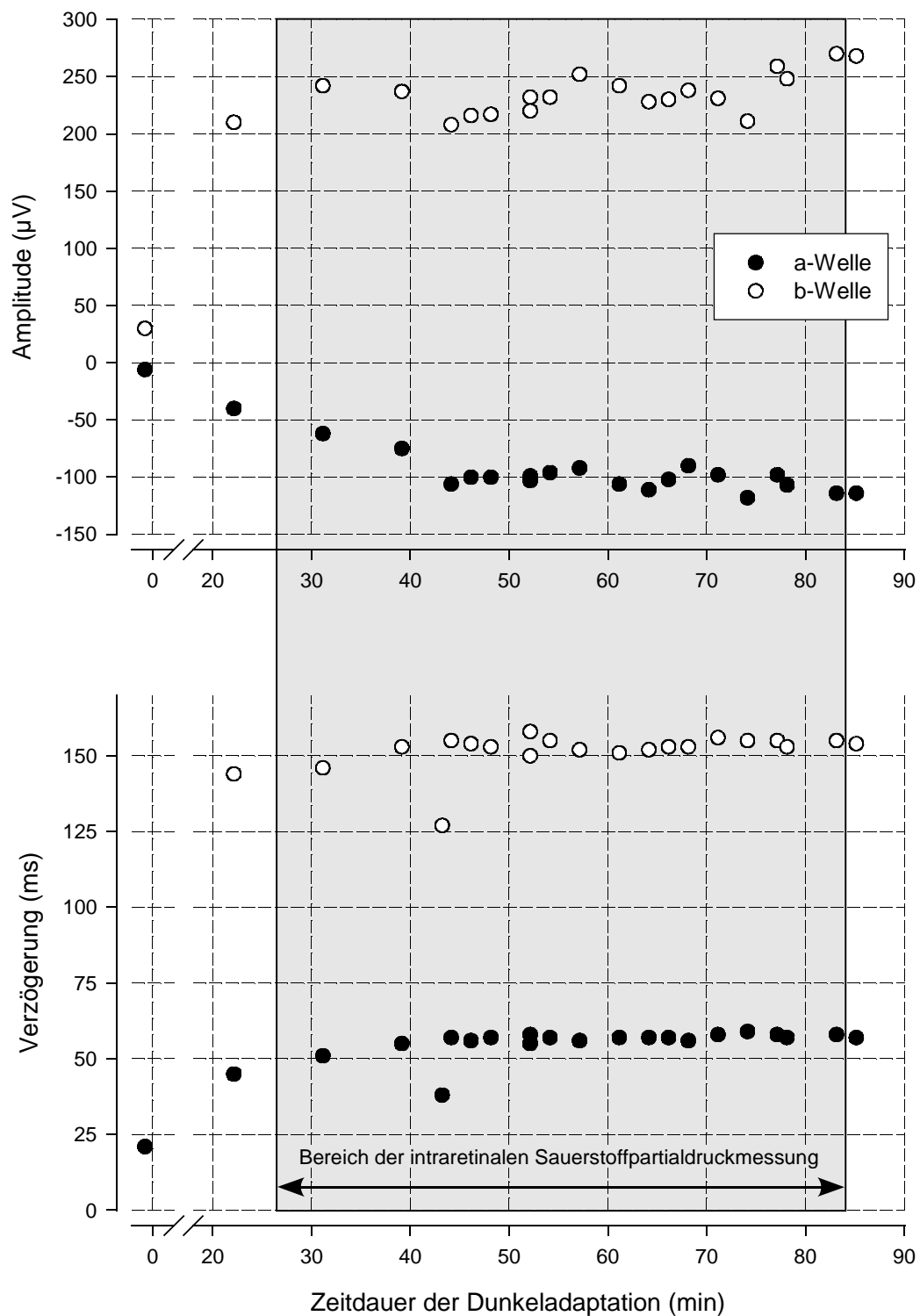


Abbildung 21: ERG-Daten während der intraretinalen Sauerstoffpartialdruckmessung.

Oben: Die Amplitude der a- und b-Welle wurde gegen die Zeit (Zeitdauer der Dunkeladaptation) aufgetragen.

Unten: Auftragung der Verzögerung der a- und b-Welle nach Reizauslösung gegen die Zeitdauer der Dunkeladaptation.

Der Bereich der intraretinalen PO_2 - Messung (O_2 -Profil s. Abbildung 19, S. 60, rechte Grafik) wurde grau hinterlegt. Während der ersten 40 min der Dunkeladaptation ist eine Änderung der aufgezeichneten Parameter zu erkennen.

4.9 Intraretinaler Sauerstoffpartialdruck bei isoliert perfundierten Augen

Root-Effekt

Der Root-Effekt des Forellenhämoglobins, gemessen an Suspensionen von Forellenerythrozyten bei unterschiedlichen pH-Werten (s. 3.4.2, S. 30), ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Sättigung des Hämoglobins, dargestellt durch die Konzentration des an Hämoglobin gebundenen O₂ ([O₂]_{Hb}), zeigt dabei über den untersuchten pH-Bereich einen sigmoidalen Verlauf.

$$f(x) = \frac{10^{\frac{x - wp}{s}} \cdot max + min}{10^{\frac{x - wp}{s}} + 1}$$

Formel für die sigmoidale Kurvenanpassung der Daten zum Root-Effekt

Parameter: [O₂]_{Hb} max. = 3,23 mM, [O₂]_{Hb} min = 1,06 mM, wp = 7,31 (pH), s = 0,39, r = 0,96 (3)

wp: Wendepunkt / s: Steigung / r: Korrelationskoeffizient

Über die Daten der Root-Effekt-Bestimmung wurde eine sigmoidale Kurvenanpassung (Fit) berechnet (s. Formel 3). Dazu wurde eine Formel mit vier Parametern verwendet: dem Maximal- (max.) und Minimalwert (min) der Konzentration des an Hämoglobin gebundenen O₂ ([O₂]_{Hb}), dem Wendepunkt (wp) und der Steigung (s) der Kurve. Die Berechnung ergab eine maximale Sauerstoffkonzentration [O₂]_{Hb} von 3,23 mM bei einem basischen pH-Wert von 8,45 und daher vollständiger Sättigung des Hämoglobins. Ausgehend von

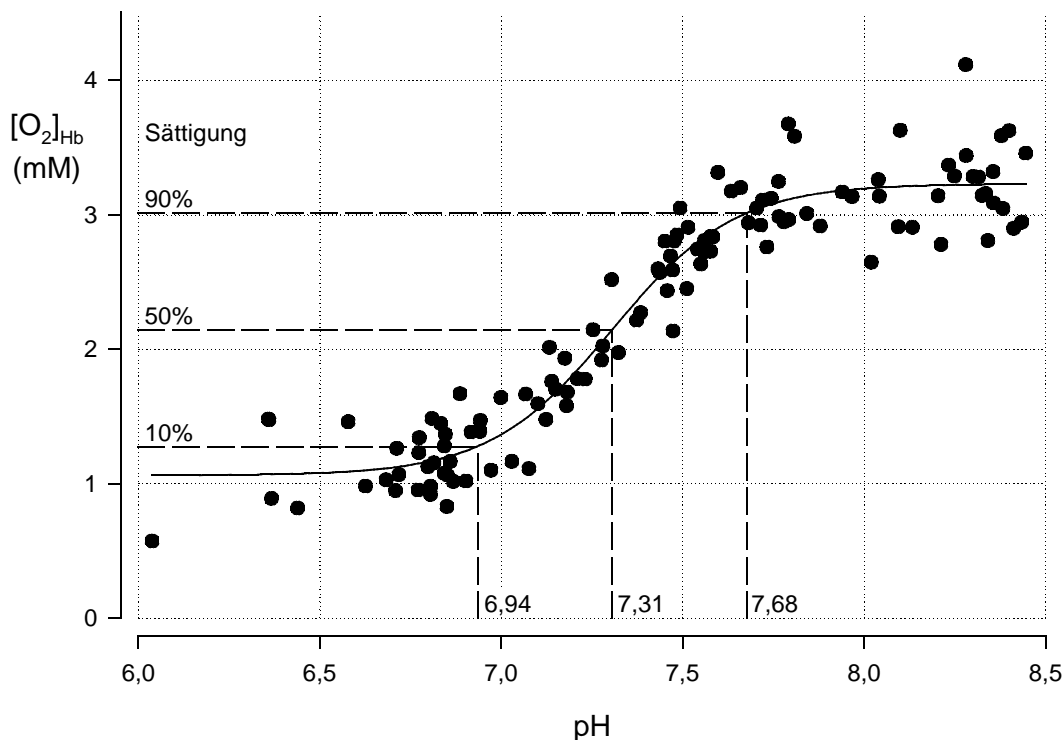


Abbildung 22: Root-Effekt: pH-Abhängigkeit der Konzentration des an Hämoglobin gebundenen Sauerstoffs ([O₂]_{Hb}) in Suspensionen von Forellenerythrozyten bei konstantem Hämatokrit.

Die Konzentration des an Hämoglobin gebundenen O₂ ist gegen den pH-Wert der Erythrozytensuspensionen aufgetragen. Zusätzlich wurden die pH-Werte bei 10, 50 und 90%iger Sättigung des Hämoglobins markiert.

diesem basischen pH-Werte sank die Sättigung bis zu einem pH-Wert von 7,68 allmählich auf 90%. Bei weiterer Ansäuerung erfolgte dann eine schnellere Abnahme der Sättigung bis auf 10% bei einem pH-Wert von 6,94. Die minimale berechnete Sauerstoffkonzentration $[O_2]_{Hb}$ betrug bei einem pH-Wert von 6,04 noch 1,06 mM, was einer Sättigung des Hämoglobins von 33% entspricht. Der Wendepunkt und damit der steilste Bereich der Kurve lag bei einem pH-Wert von 7,31. Der Korrelationskoeffizient (r) der Messwerte mit der berechneten Funktion betrug 0,96.

Perfusionsparameter

Der in einer separaten Versuchsreihe gemessene Ansaugunterdruck bei Verwendung verschiedener Perfusionslösungen sowie die dazugehörigen Hämatokrit-Werte sind in Tabelle 5 aufgeführt. Bei einer Perfusionsrate von $180 \mu\text{l min}^{-1}$ entstand durch den Widerstand des Schlauchsystem des Perfusionsaufbaus (s. 3.4.5, S. 32) bei einem Hct von 0,20 des Perfusats A ein Ansaugunterdruck von -33,9 Torr. Bei einem durch die Ansäuerung signifikant erhöhten Hct von 0,22 in Perfusat B vergrößerte sich der Ansaugunterdruck signifikant auf -37,3 Torr (ANOVA, $P < 0,05$), während bei Ansaugen von Ringer-Lösung sich der Ansaugunterdruck auf -12,8 Torr reduzierte. Der Ansaugunterdruck bei Perfusion mit Perfusat Hu wurde nicht überprüft, wurde aber wegen des identischen Hct mit Perfusat A und der vergleichbaren Dimensionen der Forellen- und Humanerythrozyten als vergleichbar zu Perfusat A eingeschätzt.

Die Daten zu den Lösungen mit denen die isolierten Augen perfundiert wurden sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Bei der Perfusion der isolierten Augen trat bei Erythrozytensuspensionen ein Druck von 104 Torr auf. Es bestand kein Unterschied der Perfusionsdrücke zwischen Perfusat A (Forellenerythrozytensuspensi-

Tabelle 5: Hämatokrit (Hct) der Proben und Unterdruck auf der Ansaugseite bei der Perfusion der isolierten Augen.

A: Suspension von Forellenerythrozyten, B: wie A aber zusätzlich durch Zugabe von HCl angesäuert.

Pumprate der Peristaltikpumpe: 180 $\mu\text{l/min}$.

Probe	Hct	Unterdruck (Torr)
A	0,20 \pm 0,01 n=8	-33,9 \pm 1,60 n=8
B	0,22 \pm 0,01 n=8	-37,3 \pm 2,67 n=6
Ringer	0,00	-12,8 \pm 1,09 n=8

Tabelle 6: Daten (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n = 3$) der zur Perfusion isolierter Forellenaugen verwendeten Perfusate (A, Hu) und Kontrollsuspensionen (C, D).

A, C, D: Suspensionen von Forellenerythrozyten, Hu: Suspension von Humanerythrozyten.

*†: dieser Hämatokritwert unterscheidet sich signifikant von denen der übrigen Proben. *: zwischen diesen beiden Sauerstoffkonzentrationen besteht kein signifikanter Unterschied. Alle pH-Werte unterscheiden sich signifikant (ANOVA, Tukey, $P < 0,05$).*

Perfusat	Hämatokrit	PCO_2 (Torr)	pH	$[HCO_3^-]$ (mM)	$[O_2]_{Hb}$ (mM)	Perfusionsdruck (Torr)	intraretinaler PO_2 (Torr)
A	0,20 \pm 0,01	2,0	7,48 \pm 0,04	2,6 \pm 0,16	2,8* \pm 0,16	103 \pm 10,9	99 \pm 1,6
Hu	0,20 \pm 0,01	2,0	7,16 \pm 0,02	1,1 \pm 0,10	3,9 \pm 0,23	104 \pm 7,5	30 \pm 3,5
Ringer				5,4		58 \pm 2,0	20 \pm 10,7
C	0,22† \pm 0,01	32,6	6,83 \pm 0,02	6,7 \pm 0,03	1,1 \pm 0,18		
D	0,18 \pm 0,02	0,25	8,15 \pm 0,07	3,4 \pm 0,63	3,1* \pm 0,27		

on) und Perfusat Hu (Humanerythrozytensuspension). Wurden die Augen mit Ringer-Lösung perfundiert, sank der Perfusionsdruck auf 58 Torr.

Der Hct der beiden eingesetzten Erythrozytensuspensionen A und Hu war mit 0,20 identisch. Beide Erythrozytensuspensionen waren mit der gleichen Ringer-Lösung (C10, S. 96) vorbereitet worden und wurden mit demselben Gasgemisch mit einem PCO_2 von 2,0 Torr äquilibriert. Trotz dieser Gleichbehandlung war der pH des Perfusats Hu mit 7,16 deutlich saurer als der pH des Perfusats A mit einem pH von 7,48. Dies wirkte sich direkt auf die Bikarbonatkonzentration der Suspension aus. So war die Bikarbonatkonzentration im Perfusat Hu mit 1,1 mM deutlich geringer als in Perfusat A (2,6 mM). Auch in der Sauerstoffkonzentration unterschieden sich die beiden Perfusionslösungen. Perfusat Hu wies mit $[O_2]_{Hb} = 3,9$ mM einen signifikant höheren Sauerstoffgehalt als Perfusat A mit $[O_2]_{Hb} = 2,8$ mM auf (s. Tabelle 6, S. 65).

Die Erythrozytensuspensionen C und D waren zur Kontrolle des Root-Effekts anders als die Perfusate A und Hu behandelt worden. Suspension C wies, nach Äquilibration mit einem Gasgemisch mit einem PCO_2 von 32,6 Torr, mit 6,7 einen niedrigeren pH-Wert und auch eine deutlich höhere Bikarbonatkonzentration als die übrigen Suspensionen auf. Der Sauerstoffgehalt war mit 1,1 mM der geringste der vier Suspensionen. Der Hct der Suspension C war signifikant höher als der aller anderen Suspensionen.

In Suspension D wurde mit 8,15 der höchste pH-Wert gemessen. Der Austausch des Plasmas gegen Ringerlösung mit 10 mM Bikarbonat und die Äquilibration mit einem PCO_2 von 0,24 Torr ergaben eine Bikarbonatkonzentration von 3,4 mM. Die Sauerstoffkonzentration war mit 3,1 mM im Bereich der O_2 -Konzentration des Perfusats A.

Die Position der für die Perfusion verwendeten Lösungen innerhalb der Root-Effekt-Kurve wird aus Abbildung 23, S. 66 deutlich. Bei den Suspensionen von Forellenerythrozyten (A) ist die Sauerstoffsättigung noch

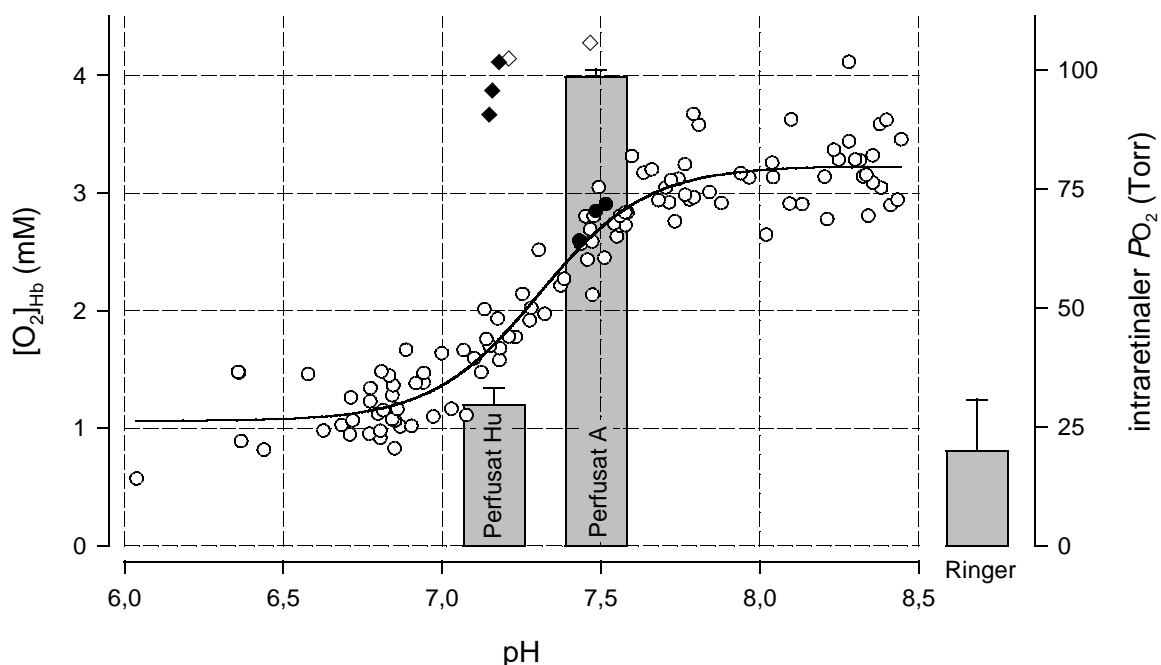


Abbildung 23: Root-Effekt und intraretinaler Sauerstoffpartialdruck.

Wie in Abbildung 22 ist die Konzentration des an Hämoglobin gebundenen O_2 (linke y-Achse) in Abhängigkeit vom pH eingezeichnet. Die für die Augenperfusionen verwendeten Perfusate A (Kreise) und Hu (Rauten) sind durch gefüllte Symbole hervorgehoben. Die bei den Proben A und Hu gemessenen intraretinalen PO_2 sind durch Balken entsprechend der pH-Werte der Proben in der Grafik dargestellt (rechte y-Achse). Der bei der Perfusion mit Ringer gemessene intraretinale PO_2 ist rechts außerhalb des Bereichs der x-Achse dargestellt.

sehr hoch, wobei die Proben schon im steilen Bereich der Root-Effekt-Kurve liegen. Die Proben mit Humanerythrozyten (Hu) sind nicht direkt mit den Suspensionen von Forellenerythozyten vergleichbar. Aus der Abbildung (23, S. 66) wird aber deutlich, dass in diesen Suspensionen die Konzentration des an Hämoglobin gebundenen O_2 deutlich höher ist als im Perfusat A. Der pH-Wert der Perfusate Hu ist dabei geringer als in den Perfusaten A.

Während der Perfusion der isolierten Augen mit Perfusat A wurde in der Retina ein PO_2 von 99 Torr gemessen (s. Tabelle 6, S. 65 und Abbildung 23, S. 66). Nach Umschalten auf Perfusat Hu fiel der retinale PO_2 , trotz der im Vergleich zum Perfusat A höheren Sauerstoffkonzentration, auf 30 Torr ab. Bei der Perfusion mit Ringerlösung konnte nur ein Partialdruck von 20 Torr gemessen werden (s. Abbildung 23, S. 66).

Die Änderungen des intraretinalen PO_2 waren nicht auf die bei den verschiedenen Perfusionlösungen aufgetretenen unterschiedlichen Perfusionsdrücke (P_{perf}) zurückzuführen (s. Abbildung 24). Beim Wechsel von Ringerlösung auf Perfusat A als Perfusionlösung war ein deutlicher Anstieg des Perfusionsdrucks und des PO_2 zu verzeichnen. Wurde von Ringer auf Perfusat Hu gewechselt, stieg nur der Perfusionsdruck stark an, während sich der PO_2 geringfügig änderte. Bei einem Wechsel von Perfusat Hu auf Perfusat A änderte sich der Perfusionsdruck kaum, während jetzt der PO_2 deutlich anstieg.

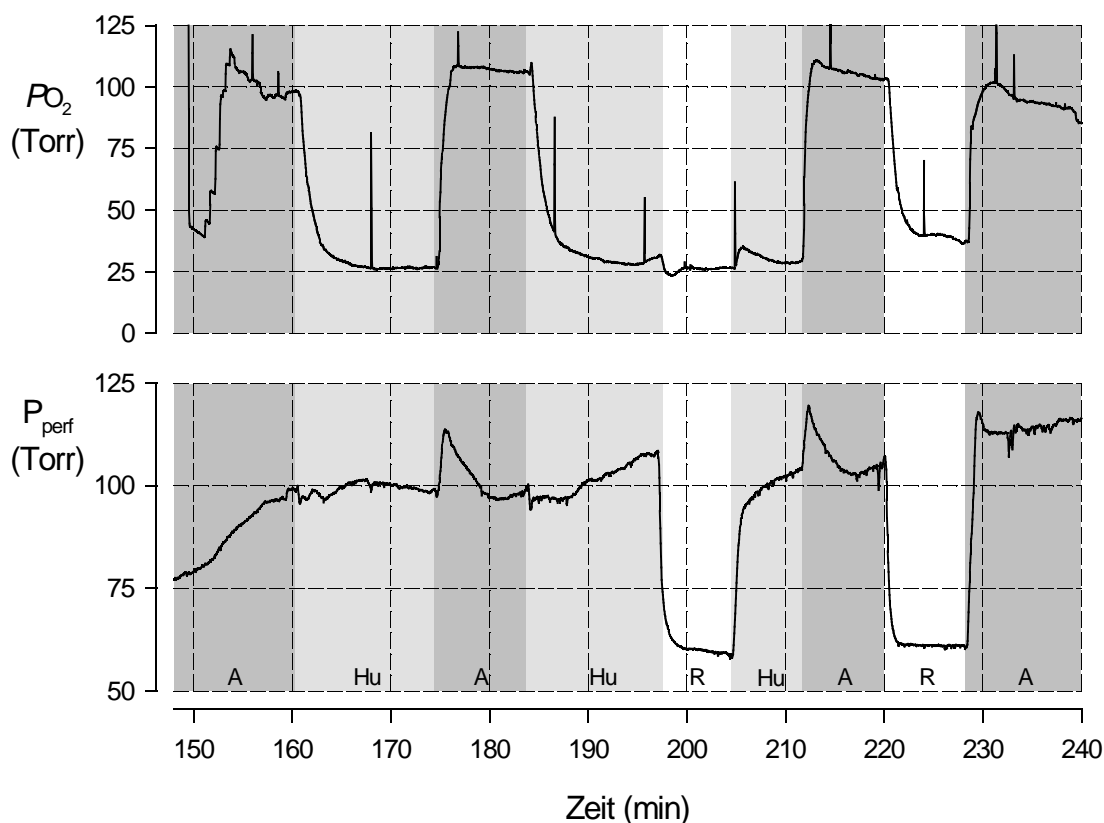


Abbildung 24: Intraretinaler Sauerstoffpartialdruck (PO_2) und Perfusionsdruck (P_{perf}) bei der Perfusion eines isolierten Auges.

Der PO_2 und P_{perf} wurden gegen die Zeit aufgetragen. Beim Wechsel der Perfusionlösungen treten deutliche Änderungen im P_{perf} und PO_2 auf. Der P_{perf} ist bei Ringer-Perfusion gering und bei den Perfusaten A und Hu hoch, während der PO_2 bei Perfusion mit Ringer und Perfusat Hu gering, bei Perfusat A dagegen hoch ist.

5. Diskussion

5.1 Versuchstiere

Die Sekretion von O_2 kann bei Knochenfischen in Schwimmblase und Auge vorkommen, wobei der Vorgang bei einer Fischart nicht generell in beiden Organen auftritt. Der Dorsch ist ein Beispiel für einen Fisch, bei dem in der Schwimmblase sowie im Auge Sauerstoffsekretion nachgewiesen wurde (SCHOLANDER, 1956; SCHOLANDER *et al.*, 1956; WITTENBERG und WITTENBERG, 1962). Beim Aal jedoch ist die Sauerstoffsekretion in der Schwimmblase gut ausgeprägt, während gassezernierende Strukturen im Auge fehlen und entsprechend dort auch kein erhöhter PO_2 nachgewiesen werden konnte (WITTENBERG und WITTENBERG, 1962; eigene Beobachtungen). Die Regenbogenforelle besitzt als physostomer Fisch keine Gassekretion in der Schwimmblase, während das choroidale *Rete mirabile* gut ausgebildet ist und erhöhte PO_2 in der Retina gemessen wurden (FAIRBANKS, 1968).

Neben ihrer leichten Verfügbarkeit in ausreichender Anzahl und Größe war die Regenbogenforelle wegen der bei ihr nur im Auge vorkommenden Sauerstoffsekretion als Versuchstier für die durchgeführten Experimente geeignet. Da bei der Regenbogenforelle keine Gassekretion in der Schwimmblase stattfindet, kann davon ausgegangen werden, dass die für die Gassekretion notwendigen Eigenschaften des Blutes allein an die Erfordernisse einer Erhöhung des PO_2 im Auge angepasst sind. Eventuell notwendige „Kompromisse“ in den Bluteigenschaften für die Gassekretion in der Schwimmblase und im Auge bei möglicherweise unterschiedlichen Anforderungen der beiden Prozesse können daher ausgeschlossen werden.

Auch die Art der Gefäßversorgung der Pseudobranchie und des Auges machen die Regenbogenforelle für die Versuche geeignet (s. 4.2, S. 47). Bei der Regenbogenforelle hat die Pseudobranchie nur ein zuleitendes Gefäß, die efferente ventrale Arterie des ersten Kiemenbogens. Da, wie oben bereits erläutert, eine Blutflussmessung an der *A. ophthalmica* nicht möglich war, konnte die Blutversorgung des Auges durch die Flussmessung in der aPA bestimmt werden. Eine entsprechende Präparation wäre z.B. bei Dorsch oder Hecht (*Esox lucius*) nicht möglich gewesen. Beim Dorsch gelangt Blut durch zwei Gefäße zur Pseudobranchie: durch die efferente ventrale Arterie des ersten Kiemenbogens und durch die sekundäre aPA, die vom *Circulus cephalicus* abzweigt (GOODRICH, 1930). Diese sekundäre aPA bildet beim Hecht die einzige Blutversorgung der Pseudobranchie (GOODRICH, 1930) und ist präparatorisch schwer zugänglich.

Ein weiterer Vorteil der Regenbogenforelle als Versuchstier ist ihre langjährige Verwendung für physiologische Untersuchungen. Es liegen damit eine Reihe von Daten über die Physiologie der Regenbogenforelle vor, die die Kontrolle und den kritischen Vergleich eigener Daten mit etablierten Literaturwerten gestatten (s. nachfolgende Abschnitte).

5.2 Systemische Parameter

Die Untersuchungen von systemischen Parametern wie Blutdruck, Herzschlag, Blut-Gas- und Säure-Base-Status sowie deren Abhängigkeit von verschiedenen Einflüssen werden seit den Arbeiten von RANDALL *et al.* (1965), HOLETON und RANDALL (1967a, b) und STEVENS und RANDALL (1967a, b) an unbetäubten, freischwimmenden Fischen durchgeführt. Dazu werden den Tieren unter Betäubung und künstlicher Ventilation Dauerkatheter implantiert. Mit den eigentlichen Experimenten wird erst nach dem Aufwachen der Versuchstiere aus der Narkose und einer oft mehrtägigen Erholungsphase, in der die Auswirkungen der Operation auf verschiedene Parameter abklingen sollen, begonnen. Diese Vorgehensweise erlaubt Messungen unter Vermei-

dung von Auswirkungen wie Fixierung der Versuchstiere bzw. Betäubung während der Probenentnahme (FRY, 1957; STEVENS und RANDALL, 1967a). Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten musste die Narkose über bis zu acht Stunden während des gesamten Versuchsverlaufs aufrechterhalten werden. Beeinträchtigungen durch Betäubung und künstliche Ventilation sind daher nicht auszuschließen. Es wurde aber besonderes Gewicht darauf gelegt, durch Überprüfung und aktive Beeinflussung vitaler Parameter einen Allgemeinzustand der Versuchstiere aufrechtzuerhalten, der, in den für die Experimente wichtigen und überprüfbaren Parametern, dem einer unbetäubten, freischwimmenden Forelle möglichst nahe kam.

Blutdruck und Herzschlag

Tabelle 7: Literaturwerte für den Blutdruck in der DA (P_{DA}) und die Herzschlagfrequenz (f_{Herz}) bei verschiedenen Temperaturen.

Die in der Tabelle aufgeführten Werte wurden an unbetäubten, freischwimmenden Forellen gemessen.

P_{DA} (Torr)	f_{Herz} (Schläge min^{-1})	T (°C)	Quelle
37,4	52	13,3	RANDALL <i>et al.</i> , 1965
34	71,2	9-19	HOLETON und RANDALL, 1967a
	73,3	15	HOLETON und RANDALL, 1967b
27,7	47	11	STEVENS und RANDALL, 1967a
	70,3	8,8	SMITH und JONES, 1982
26,3	80,8	12	BARRON <i>et al.</i> , 1987
28		11	KINKEAD und PERRY, 1991
24	72	13	MAXIME <i>et al.</i> , 1991
28		10	PERRY und THOMAS, 1991
27,8	57	10	KÄGSTRÖM <i>et al.</i> , 1994
	51,9	8	KEEN und FARRELL, 1994
	78,8	18	
25,5	62	12	KÄGSTRÖM <i>et al.</i> , 1996a
24,8	60	10	KÄGSTRÖM <i>et al.</i> , 1996b
24	60	12	LE MÉVEL <i>et al.</i> , 1996
	50	11	TAYLOR <i>et al.</i> , 1996
	90	18	
	67,5	15	LARSEN und JENSEN, 1997
22,4	72	14	BERNIER und PERRY, 1999
25	62	11-13	LE MÉVEL <i>et al.</i> , 1999
20	72	12-14	PERRY <i>et al.</i> , 1999
	74	12	HOAGLAND <i>et al.</i> , 2000

Der in dieser Arbeit an betäubten und relaxierten Regenbogenforellen gemessene Blutdruck in der DA betrug 28 Torr (s. Tabelle 2, S. 50). Die Angaben in der Literatur (s. Tabelle 7 „ P_{DA} “) für unbetäubte Forellen reichen von 20 bis 37 Torr, mit dem Gros der Werte im Bereich von 24 bis 28 Torr. Der hier gemessene Blutdruck liegt damit im Bereich der Literaturwerte. Ein Zusammenhang zwischen dem Blutdruck in der DA und der Temperatur konnte aus den vorliegenden Daten nicht festgestellt werden.

Auch die in dieser Studie bei 15°C gemessene mittlere Herzschlagfrequenz von 1,23 Hz (74 Schläge min⁻¹, s. Tabelle 2, S. 50) liegt ebenfalls im Bereich der für freischwimmende Regenbogenforellen veröffentlichten Werte (s. Tabelle 7, S. 70 „ f_{Herz} “). Im Gegensatz zum Blutdruck besteht bei der Herzschlagfrequenz eine direkte Abhängigkeit von der Temperatur (HOFFERT und UBELS, 1979). Aus den Messungen von KEEN und FARRELL (1994) und TAYLOR *et al.* (1996) kann daher für 15°C eine Herzschlagfrequenz von 70,7 bzw. 73 Schlägen min⁻¹ errechnet werden. Eine relative niedrige Herzschlagfrequenz von nur 52 Schlägen min⁻¹ geben RANDALL *et al.* (1965) für einen Temperaturbereich von 12,5 bis 14°C an, während SMITH und JONES (1982) eine vergleichsweise hohe Frequenz von 70 Schlägen min⁻¹ bei einer Temperatur von nur 9°C messen konnten.

Arterielle PO_2 - und pH-Werte

Der in der vorliegenden Arbeit im arteriellen Blut gemessene PO_2 betrug vor der Betäubung der Forellen 102 Torr und veränderte sich während der künstlichen Ventilation auf 99 Torr insignifikant (s. auch Tabelle 2, S. 50). In der Literatur finden sich Werte im Bereich von 65 bis 121 Torr (s. Tabelle 8). Der hier gemessene arterielle PO_2 liegt daher im Bereich der Literaturwerte. Das Hämoglobin im arteriellen Blut war aber während der Versuche immer vollständig gesättigt. Nach RANDALL, BEAUMONT und HOLETON (unveröffentlicht, zitiert nach STEVENS und RANDALL, 1967b) ist für die Sättigung des Hämoglobins ein PO_2 von ca. 70 Torr ausreichend. TETENS und CHRISTENSEN (1987) geben für die Regenbogenforelle bei 15°C und einem arteriellen PO_2 von ca. 102 Torr eine Hämoglobinsättigung von ca. 98% an.

In der vorliegenden Arbeit betrug der arterielle pH-Wert vor der Betäubung der Forellen bei 15°C 7,89. Während der künstlichen Ventilation wurde ein pH-Wert von 8,02 gemessen (s. auch Tabelle 2, S. 50). In Tabelle 9, S. 72, sind zum Vergleich Literaturwerte von unbetäubten, freischwimmenden Forellen zusammengestellt.

Der in dieser Arbeit gemessene arterielle pH-Wert unbetäubter Forellen weicht nicht signifikant von den in Tabelle 9, S. 72, aufgeführten Werten ab. Der während der künstlichen Ventilation gemessene pH-Wert von 8,02 ist hingegen signifikant höher als der vor der Betäubung gemessene Wert und auch als die angegebenen Literaturwerte.

Wie im vorgehenden aufgezeigt, entsprechen die in dieser Arbeit während der künstlichen Ventilation überprüften systemischen Parameter Blutdruck, Herzschlagfrequenz und arterieller PO_2 den Literaturwerten unbetäubter, freischwimmender Regenbogenforellen. Lediglich der arterielle pH-Wert während der künstlichen Ventilation weicht vom Normalwert einer ungestörten Forelle ab. Bei ersten Versuchen ohne Beimischung von CO_2 zum Äquilibriumsgas waren sogar arterielle pH-Werte von über 8,2 gemessen worden. Die

Tabelle 8: Literaturwerte arterieller Sauerstoffpartialdrucke von Forellen.

Alle Werte wurden bei 15°C an unbetäubten, freischwimmenden Regenbogenforellen gemessen.

PO_2 (Torr)	Quelle
121	HOLETON und RANDALL, 1967b
112	THOMAS und LE RUZ, 1982
65	HOLETON <i>et al.</i> , 1983
102	TETENS und CHRISTENSEN, 1987
95	PLAYLE <i>et al.</i> , 1990
108	WILKIE und WOOD, 1991
90	LARSEN und JENSEN, 1993
120	WILKIE und WOOD, 1995
100	WOOD <i>et al.</i> , 1996

sehr hohe Ventilationsrate von bis zu $10 \text{ l min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ (s. auch 3.3.1, S. 19) bei der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten künstlichen Ventilation führte wahrscheinlich zu einer ventilationsbedingten Hypocapnie und der daraus resultierenden respiratorischen Alkalose. Bei wasseratmenden Tieren ist die Differenz zwischen venösen und externen PCO_2 wegen der guten Löslichkeit von CO_2 in Wasser sehr gering. Anders als bei luftatmenden Tieren soll sich daher eine Änderung der Ventilation nur unwesentlich auf den PCO_2 im Blut auswirken (JANSSEN und RANDALL, 1975). TETENS und CHRISTENSEN (1987), PERRY und THOMAS (1991) und WILKIE und WOOD (1991, 1995) konnten jedoch eine respiratorische Alkalose bei Forellen beobachten die, trotz einsetzender metabolischer Kompensation (WILKIE und WOOD, 1991), eine Verschiebung des arteriellen pH-Wertes um 0,2 Einheiten ausmachte.

Zur Vermeidung der respiratorischen Alkalose wurde der CO_2 -Gehalt des Äquilibriumsgases mit dem Ziel erhöht, den arteriellen pH-Wert während des Experiments auf 7,9 einzustellen. Der pH-Wert wurde regelmäßig überprüft und der CO_2 -Gehalt entsprechend auftretenden pH-Änderungen angepasst. Da die pH-Messungen nur in Intervallen durchgeführt wurden und auch Veränderungen des pH-Wertes durch Änderungen des CO_2 -Gehaltes nicht genau vorhergesagt und auch nicht sofort bestimmt werden konnten, war eine exakte Regulierung des arteriellen pH-Wertes nicht möglich und die Kompensation der Hyperventilation unvollständig.

PERRY *et al.* (1999) beobachteten neben den Auswirkungen einer Hypercapnie auf das Säure-Base-Gleichgewicht auch einen Anstieg des Widerstands der systemischen Gefäße und einen daraus resultierenden Anstieg im Blutdruck in der DA bei erhöhtem externen PCO_2 . Es wird aber nicht deutlich, ob dieser Einfluss auf den Blutdruck nur durch den erhöhten PCO_2 oder durch die begleitende respiratorische Azidose verursacht wurde. Bei der hier durchgeführten künstlichen Ventilation war der PCO_2 extern erhöht, während eine respiratorische Azidose nicht auftrat. Eine Auswirkung der externen Hypercapnie auf den Blutdruck kann daher in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 9: Literaturdaten zum arteriellen Plasma-pH-Wert bei Forellen.

Alle Werte wurden bei 15°C an unbetäubten, freischwimmenden Regenbogenforellen gemessen.

pH	Quelle
7,70	HOLETON und RANDALL, 1967b
7,96	THOMAS und LE RUZ, 1982
7,81	NEUMANN <i>et al.</i> , 1983
7,93	TETENS und CHRISTENSEN, 1987
7,85	ISHIMATSU <i>et al.</i> , 1988
7,86	PLAYLE <i>et al.</i> , 1990
7,83	WILKIE und WOOD, 1991
7,91	CURTIS und WOOD, 1992
7,92	LARSEN und JENSEN, 1993
7,90	WILKIE und WOOD, 1995
7,78	WOOD <i>et al.</i> , 1996
7,89	LARSEN und JENSEN, 1997
7,98	WANG, <i>et al.</i> , 1998

5.3 Flussrate in der afferenten Arterie der Pseudobranchie

Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit die Durchblutungsrate eines Fischeauges gemessen. Wie schon unter 3.3.2.2, S. 22 beschrieben, konnte die Durchblutungsrate des Auges aus präparatorischen Gründen nicht an der *A. ophthalmica* bestimmt, sondern musste an der aPA gemessen werden. Die dabei erhaltene Flussrate von $216 \mu\text{l min}^{-1}$ ist daher geringfügig höher als die tatsächliche Durchblutungsrate des Auges, da hinter dem Ort der Flussmessung noch einige kleine Gefäße von der aPA abzweigen, die u.a. Opercularmus-

keln mit Blut versorgten (persönliche Beobachtung). Weiter besteht die Möglichkeit, dass in der Pseudo-branchie Plasma aus dem Blut in das sekundäre Kreislaufsystem übertritt und damit das Volumen des zum Auge fließenden Blutes nochmals etwas verringert wird. Beide Fehlerquellen konnten bei der hier eingesetzten Methode der Flussmessung nicht vermieden werden. Die dadurch eventuell aufgetretene Überschätzung der Blutversorgung des Auges wurde bei der Perfusion isolierter Augen berücksichtigt.

Bei offener kontralateraler aPA herrschte in den aPA der beiden Körperseiten der gleiche Druck. Unter Normalbedingungen kann daher ein signifikanter Übertritt von Blut durch die Anastomose zwischen den beiden *A. ophthalmica* (s. Abbildung 8, S. 48) von einer auf die andere Körperseite ausgeschlossen werden.

Durch den Verschluss der kontralateralen aPA fiel dort der Druck auf venöse Werte ab. Der höhere Blutdruck auf der ipsilateralen Seite führt dann zu einem Blutfluss durch die Anastomose zum kontralateralen Auge mit einem Anstieg des Flusses im ipsilateralen Gefäß auf 135% des ursprünglichen Wertes. Da die Anastomose im Vergleich mit der *A. ophthalmica* nur von geringem Durchmesser ist (s. Abbildung 8, S. 48), kann angenommen werden, dass sich der Blutfluss bei verschlossener kontralateraler aPA nicht gleichmäßig auf beiden Augen aufteilt. Eine genauere Untersuchung würde die Messung des Blutflusses in den beiden *A. ophthalmica* hinter der Anastomose erfordern.

Bei Flussmessungen wurde auf eine Eichung des Dopplersignals gelegentlich verzichtet (KAGSTRÖM *et al.*, 1996a; SUNDIN *et al.*, 1998), wenn die Aufzeichnung von Blutflussänderungen für den Versuchszweck ausreichend war. Da die Dopplerfrequenz proportional zur Flussgeschwindigkeit ist, können dann immer noch Aussagen über die Änderung der Flussrate getroffen werden. Zur Bestimmung des absoluten Volumenflusses ist aber eine Eichung des Dopplersignals notwendig. Diese Eichung wird meist nach Beendigung des Experiments *in situ* durchgeführt, da diese Methode eine zuverlässige Berechnung des tatsächlichen Volumenflusses gestattet (AXELSSON und FRITSCHKE, 1991; PELSTER und SCHEID, 1992; SUNDIN und NILSSON, 1992; vorliegend Arbeit). Wie in 3.3.2.2, S. 25 beschrieben, wurde bei der *in situ* – Eichung der Dopplerkristall so belassen, wie er für die Messung angebracht worden war. Das Gefäß wurde dann in möglichst großer Entfernung vor und hinter dem angebrachten Dopplerkristall katheterisiert. Dies gestattete zum einen, Blut durch das Gefäß mit bekannten Volumenraten hindurch zu pumpen und andererseits kann durch Höhenjustierung des Katheter auf der ausführenden Seite der Druck im Gefäß während der Perfusion kontrolliert werden. Der Gefäßabschnitt, an dem die Messung durchgeführt wurde, verbleibt so bei dieser Vorgehensweise im gleichen Zustand wie während der Messung. Diese Methode der Eichung erlaubt die direkte Kalibrierung des Flusssignals.

Alternativ könnte das Dopplersignal in einen Volumenfluss umgerechnet werden, indem der Winkel des Kristall zum Gefäß genau bestimmt und der Gefäßdurchmesser am Ort der Flussmessung gemessen wird (s. Anleitung zum Pulsed-Doppler-Flowmeter). Diese Methode wurde aber nicht gewählt, da eine genaue Winkelbestimmung nur schwer möglich ist. Zusätzlich hätte das Gefäß am Ort der Messung freipräpariert werden müssen, was eine Änderung des Gefäßdurchmessers hervorrufen kann (persönliche Beobachtung).

5.4 Intraokularer Druck

Der bei den Forellen gemessene IOP stimmt gut mit den Messungen von HOFFERT (1966) überein. HOFFERT (1966) gibt für die Regenbogenforelle einen IOP von 4,9 Torr (S.D. o. S.E.M. = 0,33 Torr, n = 54) an, ein Wert, der in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte (4,9 Torr, S.D. = 0,56 Torr, n = 8). Die Präparation des Auges für die intraretinale PO_2 – Messung hatte keine statistisch signifikante Auswirkung auf den

IOP (4,6 Torr, S.D. = 1,09 Torr, n = 8). Erst nach Entfernung der Sauerstoffmikroelektrode und der Führungskanüle konnte eine Verringerung des IOP beobachtet werden.

Die Messung des IOP fand in der vorderen Augenkammer statt, die mit einer relativ niedrigviskösen Flüssigkeit gefüllt ist. Durch Punktion der Cornea wird dieser Flüssigkeitsraum eröffnet, durch die eingesteckte Führungskanüle aber wieder abgedichtet. Die Führungskanüle ragte bis in den Glaskörper, der mit einem hochviskösen Gel gefüllt ist. Durch die Führungskanüle wurde daher an der Cornea eine Abdichtung der vorderen Augenkammer erzielt, so dass der Augeninnendruck erhalten blieb. Die hohe Viskosität der Glaskörperflüssigkeit verhinderte zusätzlich ein Austreten dieser Flüssigkeit durch die Führungskanüle, insbesondere bei eingeführter Sauerstoffmikroelektrode. Erst bei Entfernung der Mikroelektrode und der Führungskanüle wurde in einigen Fällen eine deutliche Verringerung des IOP beobachtet. Die vordere Augenkammer war dann nach außen geöffnet und durch Austreten der niedrigviskösen Flüssigkeit aus dieser Kammer konnte sich ein Druckausgleich mit der Umgebung einstellen.

Eine Veränderung der Durchblutung des Auges und damit eine eventuelle Auswirkung auf die Prozesse der Sauerstoffsekretion im Auge kann daher wegen des konstanten IOP während der intraretinalen PO_2 -Messung ausgeschlossen werden.

5.5 Intraretinaler PO_2 und Elektroretinogramme in vivo

ERGs

Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeichneten ERGs der Regenbogenforelle wiesen die für Wirbeltiere üblichen Komponenten, a-, b- und c-Wellen, auf (BROWN, 1968). Die Amplitude der a-Welle war mit $-60 \mu V$ (s. Tabelle 4, S. 61) halb so groß wie der von FONNER *et al.* (1973) bestimmte Wert von ca. $-120 \mu V$. Die Amplitude der b-Welle stimmt mit $249 \mu V$ (s. Tabelle 4, S. 61) hingegen gut mit dem Wert von FONNER *et al.* (1973) überein (ca. $250 \mu V$). HOFFERT und UBELS (1979) geben für die a- und b-Welle Amplituden von $-94 \mu V$ bzw. $281 \mu V$ an.

HAMASAKI und BRIDGES (1965) beschrieben eine negative Auswirkung des Betäubungsmittels MS222 auf das ERG von Knorpelfischen. Insbesondere fehlte die b-Welle, die nach der Verringerung der MS222-Konzentration im Beatmungswasser erschien, dann aber nur eine kleine Amplitude aufwies. Zusätzlich wiesen sie auf den schlechten Allgemeinzustand der Versuchstiere durch Betäubung hin. Mit Hinweis auf die Arbeit von HAMASAKI und BRIDGES (1965) und eigene Beobachtungen verzichteten FONNER *et al.* (1973) ebenfalls auf den Einsatz von MS222 zur Betäubung der Forellen. Auch HOFFERT und UBELS (1979) verwandten kein MS222 bei den Versuchen zur ERG-Messung, da dies das ERG beeinträchtigen sollte.

In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen während aller Versuche die Betäubung der Forellen durch MS222 aufrechterhalten. Die Konzentration des Betäubungsmittels betrug dabei mindestens 25 mg l^{-1} . (C5, S. 95) Bei dieser Konzentration konnte, im Gegensatz zu den Ergebnissen von HAMASAKI und BRIDGES (1965), FONNER *et al.* (1973) und HOFFERT und UBELS (1979), abgesehen von der etwas verringerten Amplitude der a-Welle keine negative Auswirkung des MS222 auf das ERG der Regenbogenforelle beobachtet werden.

Die Aufzeichnung des ERGs waren in der vorliegenden Arbeit von starken, aber langsamen Potentialschwankungen zwischen den beiden Ableitelektroden beeinträchtigt. Damit das Signal nicht ständig aus dem Messbereich des Verstärkers heraus driftete, musste daher ein Hochpass in die Schaltung integriert werden. Dieser Hochpass mit einer Zeitkonstante von $\tau = 10,3 \text{ s}$ (s. auch 3.3.2.5, S. 29) führte zwangsläufig zu einer Verringerung der Amplituden der einzelnen ERG-Wellen. Da die Zeitkonstante groß gegenüber dem Zeitverlauf der a- und b-Welle war, war die Auswirkung des Hochpasses auf die Amplituden dieser

beiden Wellen aber nur geringfügig. Bei einer mittleren Verzögerung der a-Welle von 35 ms betrug daher die hochpassbedingte Reduktion der Amplitude dieser Welle nur 0,34%. Die Amplitude der b-Welle, bei einer mittleren Verzögerung von 115 ms, war um 1,11% verringert. Bei diesen Angaben wurde allerdings davon ausgegangen, dass beide Wellen zum Zeitpunkt $t = 0$ sofort ihre maximale Amplitude erreicht hätten. Da die Wellen erst verzögert zum Lichtreiz auftraten, sind die hier angegebenen Reduktionswerte der Amplituden als Maximalwerte zu betrachten. Eine Korrektur der Amplituden der a- und b-Welle wurde wegen des geringen Fehlers nicht durchgeführt.

Die c-Welle, die bei der Regenbogenforelle erst nach Dunkeladaptation erscheint (FONNER *et al.*, 1973), hat einen im Vergleich zur a- und b-Welle wesentlich langsameren Zeitverlauf. Der Hochpass wirkte sich daher wesentlich stärker auf diese Komponente des ERGs aus. Die c-Welle erreichte ihr Maximum oft erst zum Ende der ERG-Aufzeichnungsperiode von 5 s. Bei einer Zeitkonstante von $\tau = 10,3$ s tritt nach 5 s eine Reduktion der Amplitude von 38,5% ein. Die Amplitude der aufgezeichneten c-Wellen würde daher nur noch knapp zwei Drittel der tatsächlichen Amplitude betragen. Da die c-Welle zusätzlich durch die Drift des ERG-Signals häufig stark beeinträchtigt war und auch nicht in allen Fällen aufgezeichnet werden konnte, wurde auf eine Auswertung der c-Welle verzichtet.

Die Konstanz der analysierten Parameter Verzögerung und Amplitude der a- und b-Welle der ERGs während der intraretinalen Sauerstoffmessung zeigte, dass die Funktion der Retina durch die Präparation des Auges und die invasive Sauerstoffmessung während des Versuchsverlaufs nicht beeinträchtigt war.

Intraretinaler PO_2

Der in der vorliegenden Arbeit gemessene maximale intraretinale PO_2 betrug 382 Torr (S.D. = 143 Torr, $n = 23$). Vergleichswerte für die Regenbogenforelle existieren nur aus der Arbeitsgruppe um HOFFERT und FROMM (s. Tabelle 10). Abgesehen von den sehr hohen Werten von HOFFERT und UBELS (1979) stimmt der in der vorliegenden Arbeit gemessene Wert gut mit den übrigen Literaturwerten überein.

Daten von anderen Fischarten (WITTENBERG und WITTENBERG, 1962, 1974; HOFFERT *et al.*, 1971; BALLINTJN *et al.*, 1977) sind mit den Werten der Regenbogenforelle nicht vergleichbar, da ein direkter Zusammenhang

Tabelle 10: Literaturwerte für den intraretinalen PO_2 bei Regenbogenforellen.

Quelle	intraretinaler PO_2 Torr, \pm S.D. (n)				Temperatur (°C)
FAIRBANKS <i>et al.</i> (1969)	445	\pm	274	(16)	13
FAIRBANKS <i>et al.</i> (1974)	453	\pm	152	(9)	13
HOFFERT und UBELS (1979)	752	\pm	484	(16)	11,4
	935	\pm	15	(5)	14,6
	640	\pm	140	(7)	20
PRATT und HOFFERT (1982)	267	\pm	32*	(?)	?
DESROCHERS <i>et al.</i> (1985)	381	\pm	147	(21)	9

*S.E.M.

zwischen der artspezifischen Ausprägung des choroidalen *Rete mirabile* und dem intraretinalen PO_2 besteht (WITTENBERG und WITTENBERG, 1974).

DESROCHERS *et al.* (1985) beschreiben für den Übergangsbereich zwischen Retina und Glaskörper einen PO_2 von 124 Torr, während in der vorliegenden Arbeit ein wesentlich geringerer Wert von 10 Torr (S.D. = 21 Torr, $n = 23$) gemessen wurde. Dieser niedrige Wert wurde wiederholt bei Messungen an geöffneten Augen festgestellt und auch bei Messungen an punktierten Augen nachgewiesen. Ein durchweg hoher PO_2 im Glaskörper wurde nicht beobachtet.

Die Dicke der Retina geben DESROCHERS *et al.* (1985) mit 324 μm an (S.D. = 10, $n = 3$). Dieser Wert korreliert gut mit dem von ihnen bestimmten Bereich des Sauerstoffprofils in der Retina von ca. 290 μm (Bruch'sche Membran bis GCL). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Dicke der Retina von 407 μm gemessen. Dieser Wert kann als minimal Dicke der Retina im Bereich der intraretinalen PO_2 – Messung betrachtet werden, da auch Messungen dünnerer Abschnitte aus der Peripherie der Retina in die Ermittlung des Wertes eingegangen sind, die Messung des intraretinalen PO_2 aber nur im posterioren Augenbereich durchgeführt wurde.

Der mittlere Vorschub der Sauerstoffmikroelektrode vom minimalen PO_2 an der ILM zum maximalen PO_2 im Bereich der Bruch'schen Membran betrug 433 μm (S.D. = 106 μm , $n = 23$). Da die Elektrode nicht senkrecht, sondern in einem kleinen Winkel in die Retina eingestochen wurde, ist davon auszugehen, dass die Dicke der Retina etwas geringer ist als der Vorschub der Elektrode vom geringsten bis zum höchsten PO_2 . Dieser Wert stimmt daher gut mit der gemessenen Dicke der Retina von 407 μm überein. Die Werte für die Dicke der Retina sind in der vorliegenden Arbeit um ca. $\frac{1}{3}$ höher als die von DESROCHERS *et al.* (1985) angegebenen, wobei die Werte zwischen gemessener Dicke der Retina und dem Bereich des Sauerstoffprofils in beiden Fällen gut übereinstimmen.

5.6 Perfusion isolierter Augen

Die Perfusion isolierter Säugetier-Augen zur Untersuchung physiologischer und pharmakologischer Aspekte ist seit den Arbeiten von MACRI (1959, 1960) und LELE und GRIMES (1960) eine etablierte Methode (SEAMAN *et al.*, 1965; TAZAWA und SEAMAN, 1969, 1972; GOURAS und HOFF, 1970; NIEMEYER, 1973, 1975, 1981, 1989; KODAMA *et al.*, 1983; ALDER *et al.*, 1986; SU *et al.*, 1994). In den meisten Fällen wurden dabei Augen mit erythrozytenfreien Lösungen, insbesondere Zellkulturmedien, perfundiert. Zur Untersuchung spezieller Aspekte der Mikrozirkulation und intravaskulären Koagulation wurde auch Blut als Perfusionsmedium verwandt (SEAMAN *et al.*, 1965; TAZAWA und SEAMAN, 1969, 1972). Das Auge war hier wegen der Transparenz okularer Strukturen und der guten Sichtbarkeit der vitrealen Gefäße als Untersuchungsobjekt ausgewählt worden. Die Perfusion der isolierten Augen wurde in der Regel durch konstanten, hydrostatischen Druck realisiert, nicht durch Einstellung einer konstanten Flussrate.

Bei den vorgenannten Arbeiten wurden insoweit Einzelaspekte untersucht, als dass zur Erarbeitung neurophysiologischer Fragestellungen „nur“ die ausreichende Versorgung der Augengewebe mit Nährstoffen sichergestellt werden musste. Dafür bietet sich die Verwendung einer in ihrer Zusammensetzung leicht zu kontrollierende erythrozytenfreie Lösung an, die i.d.R. zusätzlich mit hohen Sauerstoffpartialdrücken äquilibriert wird. Die Untersuchungen zur Mikrozirkulation wurde wegen der leichten Sichtbarkeit kleiner retinaler Blutgefäße an Augen durchgeführt.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente hatte weniger die Untersuchung von solchen Einzelaspekten als vielmehr das Zusammenwirken mehrerer Strukturen und Prozesse zum Ziel: die Sauerstoffsekretion in den Augen ist abhängig von vaskulären Strukturen (choroidales *Rete mirabile*, Choroidka-

pillaren), Stoffwechselvorgängen von Augengewebe (Ansäuerung des Blutes) und Eigenschaften des Blutes, insbesondere des Hämoglobins in den Erythrozyten.

Für die durchgeführten Perfusionen isolierter Forellenaugen mussten daher Erythrozyten-haltige Medien als Perfusate eingesetzt werden. Vollblut von Forellen wurde nicht verwandt, da der Einfluss hormoneller Bestandteile oder Metabolite im Plasma auf die Gewebe perfundierter Augen ausgeschlossen werden sollte. Der Einsatz von mit Ringer-Lösung gewaschenem Blut gestattet außerdem eine bessere Kontrolle und Konstanz der Zusammensetzung der Perfusate.

Anders als in den meisten in der Literatur beschriebenen Perfusionen isolierter Augen wurden in der vorliegenden Arbeit die Forellenaugen mit einer konstanten Flussrate perfundiert, bei gleichzeitiger Kontrolle des Perfusionsdrucks. Dieses Vorgehensweise war notwendig, um im choroidalen *Rete mirabile* einen gleichmäßigen, über den ganzen Verlauf des Experiments konstanten Fluss zu gewährleisten. Die Flussrate in den arteriellen und venösen Kapillaren des *Rete mirabile* ist von Bedeutung für die Effizienz dieses Gegenstromaustauschers (KUHN und KUHN, 1961; KUHN *et al.*, 1963).

Wie oben beschrieben (s. 5.3, S. 73) war die in der aPA gemessene Flussrate wahrscheinlich höher als die tatsächliche Durchblutungsrate des Auges. Daher wurde für die Perfusion der isolierten Augen eine Flussrate eingestellt, die mit $180 \mu\text{l min}^{-1}$ etwas unter dem in der aPA gemessenen Fluss von $216 \mu\text{l min}^{-1}$ lag. Da keine Korrelation zwischen der Flussrate in der aPA und dem Körpergewicht der Forellen nachgewiesen werden konnte (s. 4.5, S. 54) wurden alle isolierten Augen unabhängig vom Gewicht des jeweiligen Versuchstieres mit der gleichen Flussrate perfundiert.

Für die Perfusion isolierter Augen wurden Schläuche und Kapillaren mit geringem Innendurchmesser eingesetzt, um das Totvolumen des Perfusionssystems zu minimieren. Es bestand daher die Gefahr eines Unterdrucks auf der Ansaug-Seite des Systems, der zur Bildung von Mikrobläschen in den Perfusaten (Gefahr der Verstopfung von Kapillaren im Auge) oder zu einer Verringerung der Hämoglobinsättigung hätte führen können. Der Ansaugunterdruck war daher in einer Versuchsreihe überprüft worden. Der maximal gemessene Unterdruck von -37,3 Torr ($< 5\%$ vom normalen Luftdruck, s. Tabelle 5, S. 65) wird aber als so gering eingeschätzt, dass eine Veränderung des Gassättigung der Perfusate ausgeschlossen wird.

Der Druck während der Perfusionen mit Erythrozytensuspensionen betrug mit ca. 104 Torr fast das Vierfache des in der DA bei betäubten Forellen gemessenen Blutdrucks von 28 Torr. Dieser hohe Druck ist teilweise auf den Gefäßwiderstand im Auge zurückzuführen, teilweise dem zu einer feinen Spitze ausgezogenen PE10-Katheterschlauch zuzuordnen: der Perfusionsdruck bei offenem Katheter betrug mit Perfusat A 60 Torr, mit Perfusat Hu 67 Torr und hatte damit einen entsprechenden Anteil am Gesamtwiderstand. Ödembildung in Geweben des Auges oder deutliche Veränderungen okularer Strukturen durch am Gefäßeintrittspunkt doch deutlich erhöhte Perfusionsdrucke wurde nach jedem Experiment visuell überprüft, konnte aber nicht beobachtet werden.

Während der Perfusion der isolierten Augen mit Perfusat A (Suspension von Forellenerythrozyten) betrug der intraretinale PO_2 max. 99 Torr und war damit geringer als der PO_2 des mit Luft äquilibrierten Perfusats (156,5 Torr). Entsprechend wurde unter den hier eingesetzten Bedingungen keine Konzentrierung des Sauerstoffs in der Retina der künstlich perfundierten Augen erreicht.

Eine mögliche Ursache für den verringerten PO_2 in der Retina kann in einer nicht angemessenen Perfusionsrate des Auges zu suchen sein. Eine zu niedrige Flussrate in den Gefäßen des choroidalen *Rete mirabile* führt zu einer verstärkten Diffusion in Längsrichtung der Kapillaren des Gegenstromaustauschers, was die Effizienz des Systems beeinträchtigt (KUHN *et al.*, 1963). Ist die Flussrate in den Kapillaren zu hoch, kommt es womöglich zu einem unvollständigen diffusiven Austausch zwischen den venösen und arteriellen Kapillaren. Auch dann wäre mit eingeschränkter Funktion des Gegenstromaustauschers zu rechnen. Eine Ver-

suchsreihe zur Optimierung der Flussrate bezüglich des intraretinalen PO_2 wurde wegen der großen Komplikationen mit dem Perfusionsdruck und der Komplexität des Versuchsaufbaus im Verlauf dieser Untersuchung nicht durchgeführt.

Eine weitere Ursache für die fehlende Konzentrierung des O_2 in der Retina der isoliert perfundierten Augen könnte auch durch die kurzzeitige Unterbrechung der Perfusion bei der Extirpation der Augen gegeben sein. Jede Beeinträchtigung von für die O_2 -Konzentrierung notwendigen Mechanismen, z.B. durch Unterbrechung des Blutflusses oder Applizierung von CA-Hemmstoffen, führt zu einer sofortigen Abnahme des PO_2 im Auge bzw. einem Verschwinden des ERG (FONNER *et al.*, 1973; FAIRBANKS *et al.*, 1974; eigene Beobachtungen). Die Erholung von solchen Eingriffen ist dagegen sehr langsam und kann sich über Tage erstrecken (FONNER *et al.*, 1973). Es wurde daher während der Präparation der Augen besonderes Augenmerk darauf gelegt, die Unterbrechung der Durchblutung bzw. Perfusion möglichst kurz zu halten, eine Periode ohne Perfusion von ca. 1 – 3 min von der Unterbindung der *A. ophthalmica* bis zur Insertion des Katheters und dem Start der Perfusion konnte aber nicht vermieden werden. Während der danach folgenden bis zu zweistündigen Augenperfusion konnten eine wieder einsetzende Konzentrierung des Sauerstoffs in der Retina nicht beobachtet werden.

Die O_2 – Versorgung des Auges durch die Perfusate (über Hct, Hämoglobin-Gehalt, O_2 – Affinität des Hämoglobins) könnte ebenfalls die Sauerstoffkonzentrierung in der Retina negativ beeinflusst haben.

Der in den Perfusaten eingestellte Hct von 0,20 liegt am unteren Rand des für die Regenbogenforelle normalen Bereiches von ca. 0,23 – 0,33 (HOLETON und RANDALL, 1967b; GALLAUGHER *et al.*, 1995). MAXIME *et al.* (1991) bestimmten nur einen Wert von 0,171, während in anderen Arbeiten Werte von 0,184 (PERRY und GILMOUR, 1996), 0,224 (GILMOUR und PERRY, 1996) und bis zu 0,276 (THORARENSEN *et al.*, 1996) angegeben werden. Mit dem gegenüber den Normalwerten leicht verringerten Hct war auch der Gesamt- O_2 -Gehalt in Perfusat A mit 2,8 mM geringfügig herabgesetzt. MAXIME *et al.* (1991) bestimmten einen Wert von 2,92 mM und zitieren Werte von 3,35 – 4,64 mM aus anderen Arbeiten. Die Sauerstoffkonzentration im Perfusat A und insbesondere im Perfusat Hu werden daher für die Versorgung des Auges als noch ausreichend eingeschätzt.

Bezeichnend ist jedoch, dass nach dem Umschalten auf die Suspension mit Humanerythrozyten der PO_2 in der Retina schnell und signifikant abfiel. Da die Flussrate konstant gehalten wurde und sich bei der Umschaltung der Perfusionsdruck nicht änderte, kann die Änderung des intraretinalen PO_2 nicht durch Strömungseffekte im Gefäßsystem des Auges verursacht worden sein. Auch wiesen beide Perfusate wegen der gleichen Äquilibraionsbedingungen identische PO_2 – Werte auf, so dass auch dieser Parameter nicht für Unterschiede im intraretinalen PO_2 beim Wechseln zwischen Forellen- und Humanerythrozyten bei der Perfusion verantwortlich gemacht werden kann.

Weiter können Unterschiede in der Sauerstoffaffinität zwischen Forellen- und Humanhämoglobin nicht Ursache für die gemessenen Veränderungen des intraretinalen PO_2 bei Perfusatwechsel sein. Beide Perfusate waren mit einem PO_2 von 156,5 Torr äquilibriert worden, so dass das Hämoglobin in beiden Suspensionen vollständig mit Sauerstoff gesättigt war. Bei diesem PO_2 und einem übereinstimmenden Hct von 0,20 in den beiden Perfusaten war die Gesamt- O_2 -Konzentration in der Suspension mit Humanerythrozyten sogar deutlich höher als in der Suspension mit Forellenerythrozyten (s. Tabelle 6, Kapitel 4.9, S. 65). Dies kann auf eine höhere Hämoglobinkonzentration der kernlosen Humanerythrozyten gegenüber Forellenerythrozyten zurückgeführt werden. Entsprechend stand während der Perfusion mit Perfusat Hu bei gleichem PO_2 mehr O_2 zur Verfügung als bei Perfusat A.

Erst der Abfall des PO_2 während der Passage von Perfusaten durch die Gefäße des Auges kann über den Bohr-Effekt und unterschiedliche O_2 -Affinitäten von Forellen- und Humanhämoglobin zu unterschiedlicher

Freisetzung von O_2 vom Hämoglobin führen. Für Humanblut wird bei einem pH von 7,4 und einer Temperatur von $37^\circ C$ ein P_{50} von ca. 26 Torr angegeben (SCHMIDT und THEWS, 1995). Bei der Versuchstemperatur von $15^\circ C$ wird der P_{50} jedoch bei einem weit geringeren PO_2 liegen. Der ebenfalls verringerte pH-Wert von 7,16 (s. Tabelle 6, S. 65) im Perfusat Hu wirkt dieser Verschiebung des P_{50} aber entgegen. Der P_{50} wurde für die in dieser Arbeit herrschenden Bedingungen nicht kontrolliert. Inwieweit der P_{50} durch die Konzentration von 2,3-Bis-Phosphoglycerat in den Humanerythrozyten beeinflusst wurde, ist ebenfalls unbekannt.

Für Forellenhämoglobin wird bei $15^\circ C$ und einem pH von 7,9 ein P_{50} von 22,9 Torr beschrieben (BUSHNELL *et al.*, 1984). Der niedrigere pH-Wert von 7,48 des eingesetzten Perfusats A (s. Tabelle 6, S. 65) resultiert in einer Erhöhung des P_{50} .

Unter Beachtung der hier gewählten Versuchsbedingungen, insbesondere der Temperatur und des pH-Wertes der beiden Perfusate, könnte der P_{50} des Forellenhämoglobins höher als der des Humanhämoglobins gewesen sein. Damit hätte das Humanhämoglobin eine höhere O_2 -Affinität und würde O_2 weniger leicht abgeben als das Forellenhämoglobin. Voraussetzung dafür ist natürlich, dass der PO_2 in den Suspensionen im Auge durch Gewebsatmung auf Werte von deutlich unterhalb von ca. 80 Torr abgenommen hätte. Die auf der Basis von Temperatur und pH-Werten zu erwartenden Unterschiede in der O_2 -Affinität werden aber als Ursache für die unterschiedlichen intraretinalen PO_2 – Werte als zu gering eingeschätzt.

5.7 Physiologie

Der Prozess der aktiven Erhöhung des PO_2 über externe/arterielle Werte hinaus, bisher nur für die Schwimmblase und das Auge von Knochenfischen beschrieben, wird durch eine Kombination biochemischer Eigenschaften des Blutes und geordneter anatomischer Anordnung von Blutgefäßen ermöglicht. Die Untersuchungen zu einzelnen Aspekten (Root-Effekt: ROOT, 1931; Review: PELSTER und RANDALL, 1998; Funktion des Gegenstromaustauschers: KUHN *et al.*, 1963) sind weit fortgeschritten, allein physiologische Experimente an Organen oder lebenden Tieren gestalten sich als eine schwierige Herausforderung, da insbesondere im Auge von Fischen die Gefäße im Bereich des choroidalen *Rete mirabile* und der Choriokapillaren für eine Entnahme von Blutproben, die für die Funktionsuntersuchung dieser Gefäßbereiche unabdingbar wäre, kaum zugänglich sind. Durch den im Vergleich zu den Gefäßen des Auges relativ problemlosen Zugang zu Gefäßen der Schwimmblasen - *Rete mirabile* beim Aal, konnten hier detaillierte physiologische Untersuchungen durchgeführt werden (SCHOLANDER, 1954; STEEN, 1963; KOBAYASHI *et al.*, 1989a, b, 1990; PELSTER und SCHEID, 1992). Wegen der ähnlichen Anordnung der vaskulären Strukturen in der Schwimmblase und im Auge und der offensichtlich gleichen Funktion des Gefäßsystems zur Partialdruckerhöhung des O_2 wurden diese an der Schwimmblase des Aals nachgewiesenen Prozesse weitestgehend auf das Auge der Knochenfische übertragen.

Weitere Beobachtungen führten aber zu einer Differenzierung dieser Annahme. Zum einen konnte MAETZ (1956) zeigen, dass eine starke Ansäuerung des Blutes die Retina bis zur Erblindung schädigt. Des weiteren wiesen WITTENBERG und WITTENBERG (1974) nach, dass die Länge der Kapillaren im choroidalen *Rete mirabile* bei den von ihnen untersuchten Fischarten (86 Arten mit Körpergewichten von wenigen Gramm bis 200 kg) unabhängig vom maximalen PO_2 in der Retina relativ konstant war (1,4 mm, Min: 0,52 mm, Max: 1,8 mm), aber die Anzahl der Kapillaren bzw. Größe des choroidalen *Rete mirabile* positiv mit dem im Auge gemessenen PO_2 korrelierte. Beim *Rete mirabile* der Schwimmblase besteht ein Zusammenhang zwischen der Länge der Kapillaren und der Tiefe des normalen Lebensraumes der Fische (MARSHALL, 1960; DENTON, 1961). Auch in einem wichtigen Aspekt des zellulären Stoffwechsels unterscheiden sich die Gassekretionsprozesse im Auge und in der Schwimmblase. Das Gewebe der Gasdrüse in der Schwimmblase bildet aus

Glukose Milchsäure, die der Ansäuerung des Blutes zur Gassekretion dient. Dieser anaerobe Abbau der Glukose wird auch durch hohe PO_2 nicht beeinträchtigt. Das Gasdrüsengewebe weist daher keinen Pasteur-Effekt auf (BALL *et al.*, 1955; D'Aoust, 1970; WASER, 1994). Eine Regulation der Gassekretion erfolgt daher wohl weniger über eine Regulation des Stoffwechsels als über die Durchblutungsrate des *Rete mirabile* (SCHOLANDER, 1956; WAHLQVIST, 1980). Die Retina, die analog zum Gasdrüsengewebe der Schwimmblase als das Gewebe betrachtet wird, das durch Produktion von Säure die Erhöhung des PO_2 in den Choriokapillaren auslöst, weist im Gegensatz zur Gasdrüse in der Schwimmblase einen deutlichen Pasteur-Effekt auf (NAKASHIMA, 1928; HOFFERT und FROMM, 1970; BAeyENS *et al.*, 1971). Eine Regulation der Sauerstoffsekretion erfolgt hier eher über den Stoffwechsel und nicht über die Durchblutungsrate.

Auch im eigentlichen Zweck der Gaskonzentrierung unterscheiden sich die Schwimmblase und das Auge. In der Schwimmblase muss zur Einstellung eines neutralen Auftriebs Gas in ein gasgefülltes Kompartiment abgegeben werden. Der Partialdruck der Gase in der Schwimmblase ändert sich dort mit dem hydrostatischen Druck und damit ändern sich auch die Anforderungen an die Gassekretion in Abhängigkeit von der Tiefe. Gleichzeitig ist die Art des sezernierten Gases von untergeordneter Bedeutung, d.h. alle Mechanismen, die den Gaspartialdruck erhöhen, können genutzt werden. Im Auge hingegen existiert kein gasgefüllter Bereich. Die Gaspartialdrucke sind daher nur unwesentlich vom hydrostatischen Druck abhängig (ENNS *et al.*, 1965), so dass die Gassekretion unabhängig von der Tiefe des Lebensraums erfolgt. Diese Tatsache al-

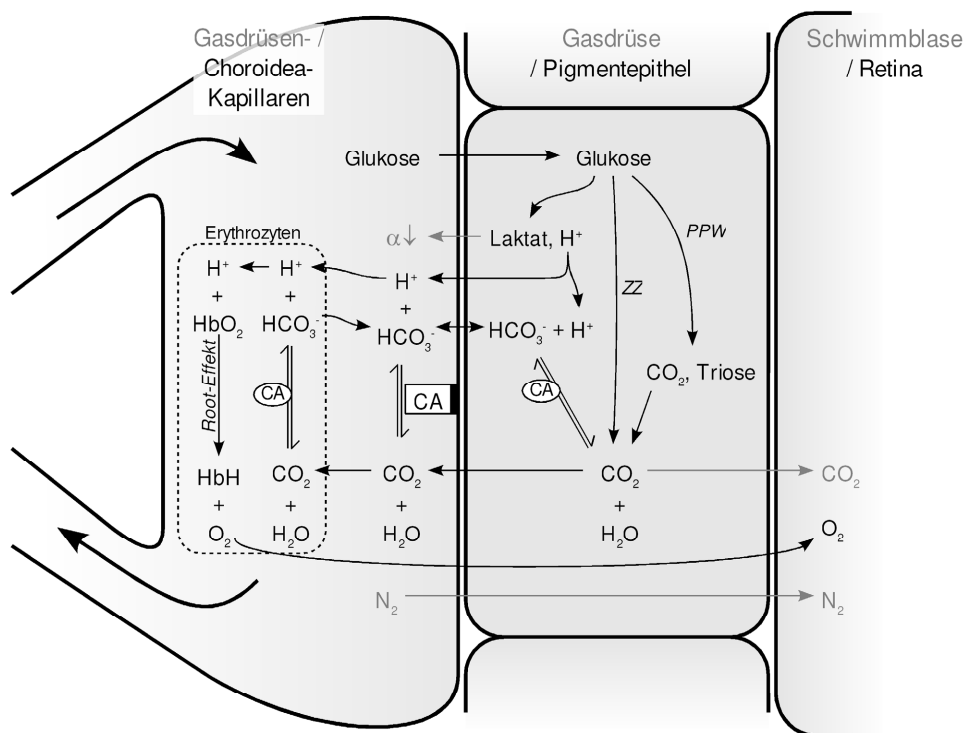


Abbildung 25: Postulierter Mechanismus der Gassekretion im Bereich der Gasdrüse / der Retina (nach Fairbanks *et al.*, 1969, 1974 und PELSTER und SCHEID, 1992, verändert).

Durch den Stoffwechsel der Gasdrüsen- bzw. Pigmentepithelzellen entstehen Säureäquivalente (Milchsäure, Dissoziation von CO₂) die über eine Ansäuerung in den Erythrozyten den Root-Effekt auslösen und O₂ von seiner Bindung an Hämoglobin freisetzt.

CA: Carboanhydrase; PPW: Pentose-Phosphat-Pathway; ZZ: Zitrat-Zyklus; $\alpha \downarrow$: Aussalzeffekt (Verringerung des Löslichkeitsfaktors von Gasen durch Erhöhung der Osmolytkonzentration)

lein mag schon für die uniforme Länge der Kapillaren des choroidalen *Rete mirabile* (WITTENBERG und WITTENBERG, 1974) bei den verschiedenen Fischarten verantwortlich sein. Im Auge ist auch nur die Erhöhung des PO_2 von Bedeutung, die Konzentrierung anderer Gase (N_2 , Edelgase) ist nicht notwendig und könnte sogar kontraproduktiv sein (CO_2 : FAIRBANKS *et al.*, 1974; WITTENBERG und HAEDRICH, 1974; PELSTER und RANDALL, 1998).

Der postulierte Mechanismus der Gassekretion in der Schwimmblase und im Auge ist in den Abbildungen 25, S. 80 und 26 dargestellt:

Über die anaerobe Glykolyse wird Milchsäure, über den Pentose-Phosphat-Weg (PPW, Schwimmblase: WALSH and MILLIGAN, 1993; Auge: HOFFERT und FROMM, 1970) und den Zitrat Zyklus (ZZ) CO_2 gebildet. Diese Produkte verursachen eine Ansäuerung des Blutes die sich auf das Innere der Erythrozyten überträgt und dort zur Auslösung des Root-Effekts führt. Eine direkte Ansäuerung der Erythrozyten erfolgt über CO_2 , das wegen seiner leichten Diffusibilität schnell in die Erythrozyten gelangt und dort durch die CA-katalysierte Reaktion zur Ansäuerung führt. Über eine extrazelluläre CA kann zusätzlich die Ansäuerung des Plasmas durch Bildung von CO_2 aus Protonen und Bikarbonat gepuffert werden. Das CO_2 kann dann wiederum in die Erythrozyten diffundieren. Eine Anhebung aller Gaspartialdrucke durch Aussalzen ist in der Schwimmblase von größerer Bedeutung als in den Choriokapillaren (s. „ $\alpha\downarrow$ “ in Abbildung 25, S. 80).

Im Bereich des *Rete mirabile* findet dann eine Rückdiffusion von Gasen und Säureäquivalenten aus den venösen in die arteriellen Kapillaren statt (KOBAYASHI *et al.*, 1989a, b, 1990). Dabei kommt es schon in den arteriellen Kapillaren des *Rete mirabile* zu einem Anstieg des PO_2 , der aber zu einem großen Teil durch den Transfer von Säureäquivalenten und den damit ausgelösten Root-Effekt verursacht werden kann und weniger durch aktuelle Rückdiffusion von O_2 von venösen in arterielle Kapillaren (KOBAYASHI *et al.*, 1990). Da ei-

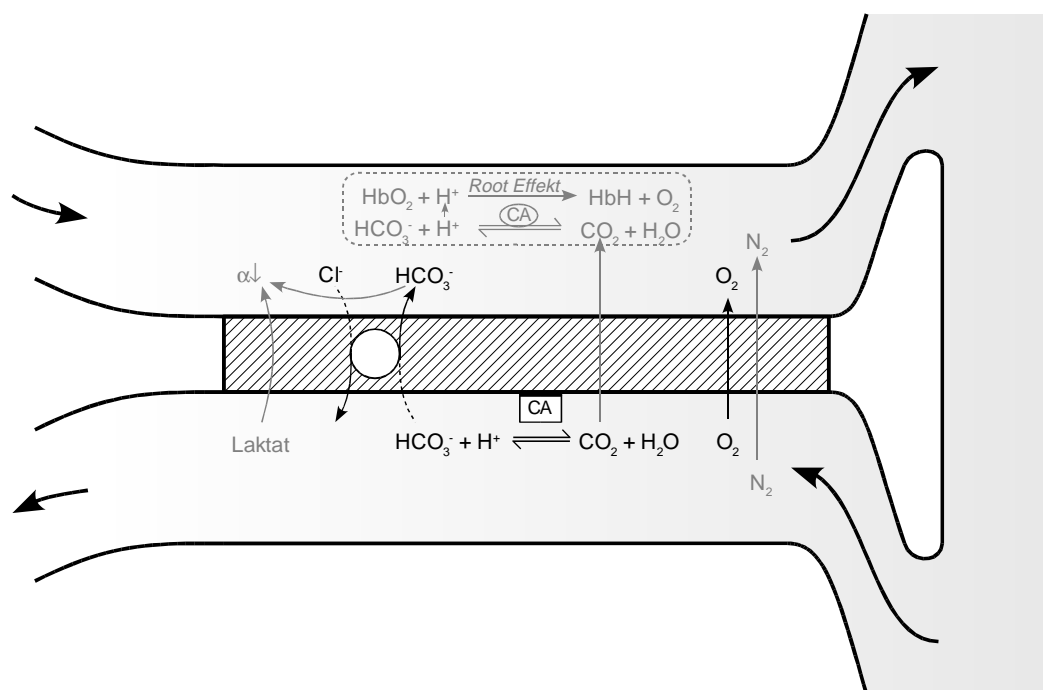


Abbildung 26: Schema der Vorgänge im Bereich des Gegenstromaustauschers (nach FAIRBANKS *et al.*, 1969, 1974 und PELSTER und SCHEID, 1992, verändert).

Die in der Schwimmblase stattfindenden Vorgänge (Rückdiffusion von N_2 und CO_2 sowie die Auslösung des Root-Effekts in den arteriellen Kapillaren) sind grau dargestellt. Im Auge soll durch eine dem Plasma zugängliche CA das CO_2 in Bikarbonat umgewandelt werden, welches dann per Ionenaustauschprozess in die arteriellen Kapillaren gelangt. Eine Aufkonzentrierung des CO_2 durch den Gegenstromaustauscher soll damit vermieden werden (FAIRBANKS *et al.*, 1974).

ne Konzentrierung von CO_2 im Gegenstromaustauscher des Auges für die Retina wegen des dann deutlich verringerten pH-Wertes des Blutes nachteilig wäre (FAIRBANKS *et al.*, 1974; WITTENBERG und HAEDRICH, 1974; Review: PELSTER und RANDALL, 1998), postulieren FAIRBANKS *et al.* (1974) eine extrazelluläre CA auf der Oberfläche der Endothelzellen der venösen Kapillaren (s. „CA“ in Abbildung 26, S. 81). Durch Umwandlung von CO_2 in Bikarbonat und Transfer des Bikarbonats in die arteriellen Kapillaren (im Austausch mit Chlorid-Ionen) würde damit zum einen die progressive Konzentrierung von CO_2 durch das Gegenstromsystem vermieden und zusätzlich stände das jetzt wieder in den Kreislauf gelangte Bikarbonat zur Pufferung der in der Retina gebildeten Milchsäure zur Verfügung. Die Rückdiffusion von Osmolyten (Milchsäure und Bikarbonat) in die arteriellen Kapillaren würde hier durch den Aussalzeffekt die Partialdrucke aller physikalisch gelösten Gase anheben, ein Prozess, der in der Schwimmblase von Bedeutung, im Auge aber unwichtig ist.

Zusätzlich kompliziert wird der Prozess der Gassekretion im Auge noch durch die bisher nicht geklärte Funktion der vorgeschalteten Pseudobranchie. Es wird aber postuliert, dass dieses Organ die Blutzusammensetzung so beeinflusst, dass im Auge eine wirkungsvolle Erhöhung des PO_2 ausgelöst werden kann, ohne dass es zu einer gleichzeitigen Konzentrierung von CO_2 und einer dann unvermeidbaren starken Absenkung des pH-Wertes des Blutes kommt (LEINER, 1938; WITTENBERG und HAEDRICH, 1974). Dies soll durch eine Ansäuerung des Blutes schon in der Pseudobranchie geschehen (Bridges *et al.*, 1998), die den pH-Wert des Blutes bis knapp vor Einsetzen des Root-Effekts absenkt, so dass durch eine minimale weitere Ansäuerung im Auge O_2 vom Hämoglobin freigesetzt werden kann.

Um eine zu weitgehende Ansäuerung des Blutes in den Choriokapillaren zu vermeiden, schlagen PELSTER und RANDALL (1998) vor, dass durch einen starken Root-Effekt die Freisetzung des O_2 vom Hämoglobin gewährleistet ist, gleichzeitig aber durch einen eher „ineffizienten“ Gegenstromaustauscher, charakterisiert durch den nur kurzen parallelen Verlauf der arteriellen und venösen Kapillaren, der erhöhte PO_2 erhalten werden kann, eine Konzentrierung von CO_2 aber vermieden wird.

Untersuchungen zur Sauerstoffkonzentrierung im Auge hatten bisher den Nachteil, dass sie nur indirekter Natur waren. So wurden die Auswirkungen von Behandlungen auf den direkt messbaren intraretinalen PO_2 oder das ERG untersucht (FAIRBANKS *et al.*, 1969, 1974; FONNER *et al.*, 1973; BALLINTIJN *et al.*, 1977; HOFFERT und UBELS, 1979). Im Vordergrund stand dabei die Erarbeitung der Funktion der CA für die Sauerstoffkonzentrierung (FAIRBANKS *et al.*, 1969, 1974; FONNER *et al.*, 1973). Speziell wurde untersucht, inwieweit sich eine Hemmung der CA auf den PO_2 im Auge (FAIRBANKS *et al.*, 1969, 1974; BALLINTIJN *et al.*, 1977) bzw. auf die Funktion der Retina (FONNER *et al.*, 1973) auswirkte. Dazu wurden den Fischen während der Messung des intraretinalen PO_2 bzw. des ERGs CA-Hemmstoffe injiziert und deren Auswirkung auf den intraretinalen PO_2 bzw. das ERG beobachtet. Eine Hemmung der CA-Aktivität hat wegen ihrer weiten Verbreitung im verschiedenen Organen des Körpers und ihrer Beteiligung an unterschiedlichsten Prozessen (HENRY und HEMMING, 1998) aber systemische Auswirkungen, die nicht auf die Funktion der Gassekretion beschränkt werden können. So wird nach Injektion von CA-Hemmstoffen neben einer fast sofortigen starken Abnahme des intraretinalen PO_2 und einem vollständigem Verschwinden des ERGs ein Erblinden und eine sofortige Dunkelfärbung der Fische beschrieben (FAIRBANKS *et al.*, 1969, 1974; FONNER *et al.*, 1973; BALLINTIJN *et al.*, 1977). Gleichzeitig änderte sich der pH-Wert des arteriellen Blutes von 7,61 auf 7,38 (HOFFERT und FROMM, 1966; FAIRBANKS *et al.*, 1969). Auch der Transport von CO_2 durch das Blut wird durch Hemmung der CA deutlich beeinträchtigt.

Bei den Arbeiten aus der Arbeitsgruppe um Hoffert und Fromm (HOFFERT und FROMM, 1966; FAIRBANKS *et al.*, 1969, 1974) fällt zusätzlich auf, dass als normaler arterieller PO_2 für die Forelle extrem niedrige Werte von

nur 20 Torr bzw. eine postbranchiale Hämoglobinsättigung von nur 30% angegeben werden. Diese Werte entsprechen eher denen venösen Blutes (STEVENS und RANDALL, 1967b). HOFFERT und FROMM (1966) beschreiben selber, dass das aus der DA entnommene Blut dunkelrot war und sich durch Äquilibration mit 95% O₂ / 5% CO₂ deutlich hellrot verfärbte. Entweder wurde in den genannten Untersuchungen versehentlich venöses anstatt arterielles Blut analysiert, oder die Ventilation der Forellen während der Experimente war völlig unzureichend. Inwieweit sich dies auch auf die Ergebnisse der Sauerstoffmessung im Auge ausgewirkt haben könnte, bleibt offen. Trotz der extrem niedrigen arteriellen PO₂-Werte konnten FAIRBANKS *et al.* (1969) einen maximalen intraretinalen PO₂ von 445 Torr nachweisen.

In einer weiteren Arbeit untersuchen HOFFERT und UBELS (1979) die Auswirkung der Ventilation und Temperatur auf den intraretinalen PO₂ und das ERG der Regenbogenforelle. Die arteriellen PO₂-Werte schwankten hier zwischen 13 Torr bei niedriger Ventilationsrate und hoher Temperatur und 63 Torr bei hoher Ventilationsrate und niedriger Temperatur. Der arterielle pH-Wert bewegte sich dabei zwischen 7,22 und 7,62. Dennoch wurden intraretinale PO₂-Werte von über 300 Torr gemessen. Unter diesen Rahmenbedingungen scheint eine Untersuchung der vom O₂ – Gehalt und pH abhängigen O₂ – Konzentrierung im Auge wenig aussagekräftig.

Ebenfalls untersucht wurde die Funktion der Pseudobranchie auf den Prozess der Sauerstoffsekretion im Auge. Dies geschah entweder durch Extirpation nur der ipsilateralen (FAIRBANKS *et al.*, 1969; BALLINTIJN *et al.*, 1977) bzw. beider Pseudobranchien (BALLINTIJN *et al.*, 1977) oder durch Ligatur der ipsilateralen aPA nach Kauterisierung der kontralateralen Pseudobranchie (FONNER *et al.*, 1973). Nach unilateraler Pseudobranchiektomie konnten FAIRBANKS *et al.* (1969) noch einen intraretinalen PO₂ von 57 Torr nachweisen. Diesen Wert, für die Autoren höher als der von ihnen bestimmte arterielle PO₂ von 20 Torr, führen sie auf die Konzentrationsleistung des lentiformen Körpers, neben dem choroidalen *Rete mirabile* ein weiteres Kapillarsystem im Auge von Knochenfischen, zurück. Schon COPELAND (1980) aber wies nach, dass der lentiforme Körper wegen seiner vaskulären Verbindungen keinen Beitrag zur Sauerstoffkonzentrierung im Auge leisten kann. Außerdem ist ein intraretinaler PO₂ von 57 Torr deutlich niedriger als der normale arterielle PO₂ der Forelle (s. Tabelle 8, S. 71). BALLINTIJN *et al.* (1977) hingegen konnte bei unilateraler Pseudobranchiektomie keine deutliche Verringerung des intraretinalen PO₂ weder im kontralateralen noch im ipsilateralen Auge nachweisen. Erst bei bilateraler Pseudobranchiektomie ging der intraretinale PO₂ auf Werte unterhalb des arteriellen PO₂ zurück. Der Verschluss der ipsilateralen Pseudobranchienarterie führte, nach vorhergehender Kauterisierung der kontralateralen Pseudobranchie, auch zu einer sofortigen Beeinträchtigung des ERGs (FONNER *et al.*, 1973; eigene Beobachtungen).

Wie die Versuche mit CA-Hemmstoffen sind auch die Experimente zur Funktion der Pseudobranchie für die Sauerstoffsekretion im Auge nur von begrenzter Aussagekraft. COPELAND (1980) fasst dies so zusammen: „From these research reports [u.a. Ballintijn *et al.*, 1977] the general conclusion can be reached that bilateral extirpation of the pseudobranch is disastrous to the normal functioning of the eye.“ Da eine Manipulation der Pseudobranchie in der Art wie oben aufgeführt immer auch die Blutversorgung des Auges mit beeinflusst, kann aus solchen Versuchen eigentlich noch nicht einmal eine Funktion der Pseudobranchie für den Sehprozess in der Retina abgeleitet werden.

5.8 Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode der Perfusion isolierter Augen gestattet eine direktere Untersuchung der Funktion des Gegenstromaustauschers und der Auswirkung von Blutparametern auf die Sauerstoffversorgung der Retina der Knochenfische als dies durch Experimente an betäubten Fischen möglich ist.

Hier wurde, durch den Wechsel auf ein Perfusat mit einem Hämoglobin, das keinen Root-Effekt besitzt, zum ersten Mal direkt nachgewiesen, dass der Root-Effekt eine notwendige Voraussetzung für die Erhöhung des PO_2 in der Retina ist. Eine aktive Konzentrierung des O_2 in der Retina konnte bei den isoliert perfundierten Augen nicht gezeigt werden. Bei Umschaltung auf das Perfusat mit Humanerythrozyten sank der intraretinale PO_2 aber trotz identischem PO_2 in den Perfusaten und höherem Gesamt- O_2 -Gehalt des Perfusats Hu auf Werte ab, die im Bereich der Werte lagen, die auch bei der Perfusion des Auges mit Ringer gemessen wurden (s. Tabelle 6, S. 65).

Die Methode der künstlichen Perfusion isolierter Augen bietet sich dazu an, weitere Funktionen von Eigenschaften des Blutes auf die Sauerstoffkonzentrierung in der Retina zu untersuchen. Da die im Organismus der Blutversorgung des Auges vorgeschaltete Pseudobranche durch die Perfusion isolierter Augen ausgeschaltet wurde, kann mit dieser Methode die Funktion des choroidalen *Rete mirabile* wesentlich gezielter untersucht werden, da, wie z.B. bei der Applikation von Hemmstoffen der CA, systemische Reaktionen, die im Gesamtorganismus nicht vermieden werden können, bei isolierten Augen keine Rolle spielen.

6. Literatur

- L1 Albers, J.A.A. (1806) Über das Auge des Kabeljau *Gadus morhua* und die Schwimmblase der Seeschwalbe, *Trigla hirundo*. Götting. gelehr. Anz., 2: 681-682
- L2 Alder, V.A., Niemeyer, G., Cringle, S.J. and Brown, M.J. (1986) Vitreal oxygen tension gradients in the isolated perfused cat eye. *Curr. Eye Res.*, 5: 249-256
- L3 Axelsson, M. and Fritsche, R. (1991) Effects of exercise, hypoxia and feeding on the gastrointestinal blood flow in the Atlantic cod *Gadus morhua*. *J. exp. Biol.*, 158: 181-198
- L4 Baeyens, D.A., Hoffert, J.R. and Fromm, P.O. (1971) Aerobic glycolysis and its role in maintenance of high O₂ tensions in the teleost retina. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137: 740-744
- L5 Ball, E.G., Strittmatter, C.F. and Cooper, O. (1955) Metabolic studies on the gas gland of the swimbladder. *Biol. Bull.*, 108(1): 1-17
- L6 Ballintijn, C.M., Beatty, D.D. and Sauders, R.L. (1977) Effects of pseudobranchectomy on visual pigment density and ocular PO₂ in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *J. Fish. Res. Board Can.*, 34: 2185-2192
- L7 Barnett, C.H. (1951) The structure and function of the choroidal gland of teleostean fish. *J. Anat.*, 85: 113-119
- L8 Barron, M.G., Tarr, B.D. and Hayton, W.L. (1987) Temperature-dependence of cardiac output and regional blood flow in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 31(6): 735-744
- L9 Berenbrink, M. (1995) Die Kontrolle des intrazellulären pH in den Erythrozyten von Knochenfischen. Shaker, Aachen
- L10 Bernier, N.J. and Perry, S.F. (1999) Cardiovascular effects of angiotensin-II-mediated adrenaline release in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. exp. Biol.*, 202(1): 55-66
- L11 Boutilier, R.G., Heming, T.A. and Iwama, G.K. (1984) Appendix: Physicochemical parameters for use in fish respiratory physiology, in: Hoar, W.S. and Randall, D.J. (ed.) *Fish Physiology*. Vol. X, Part A: Gills; Anatomy, Gas-Transfer, and Acid-Base Regulation. Academic Press, New York
- L12 Bridges, C.R. (1983) PO₂ and oxygen content measurement in blood samples using polarographic oxygen sensors. in: Gnaiger, E. and Forster, H. (ed.) *Polarographic Oxygen Sensors*. Springer, Berlin, Heidelberg
- L13 Bridges, C.R., Berenbrink, M., Müller, R. and Waser, W. (1998) Physiology and biochemistry of the pseudobranch: an unanswered question? *Comp. Biochem. Physiol. A*, 119(1): 67-77
- L14 Brittain, T. (1987) The root effect. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 86(3): 473-481
- L15 Brown, K.T. (1968) The electroretinogram: its components and their origins. *Vision Res.*, 8: 633 - 677
- L16 Bushnell, P.G., Steffensen, J.F. and Johansen, K. (1984) Oxygen consumption and swimming performance in hypoxia-acclimated rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. exp. Biol.*, 113: 225-235
- L17 Chase, J. (1982) The evolution of retinal vascularization in mammals. *Ophthalmology*, 89: 1518-1525

- L18 Copeland, D.E. (1980) Functional vascularization of the teleost eye. *Curr. Top. Eye Res.*, 3: 219-280
- L19 Curtis, B.J. and Wood, C.M. (1992) Kidney and urinary-bladder responses of fresh-water rainbow trout to isosmotic NaCl and NaHCO₃ infusion. *J. exp. Biol.*, 173: 181-203
- L20 D'Aoust, B.G. (1970) The role of lactic acid in gas secretion in the teleost swimbladder. *Comp. Biochem. Physiol.*, 32: 637-668
- L21 Davis, J.C. and Cameron, J.N. (1971) Water flow and gas exchange at the gills of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. exp. Biol.*, 54: 1-18
- L22 Denton, E.J. (1961): The buoyancy of fish and cephalopods. *Progr. Biophys. Biophys. Chem.*, 1: 178-234
- L23 Desrochers, P.E., Pratt, K.A., Fromm, P.O. and Hoffert, J.R. (1985) Oxygen diffusion in the trout retina. *Exp. Eye Res.*, 41: 607-618
- L24 Dollery, C.T., Bulpitt, C.J. and Kohner, E.M. (1969) Oxygen supply to the retina from the retinal and choroidal circulations at normal and increased arterial oxygen tensions. *Invest. Ophthalmol.*, 8: 588-594
- L25 Enns, T., Scholander, P.F. and Bradstreet, B.D. (1965) Effect of hydrostatic pressure on gases dissolved in water. *J. physical Chem.*, 69(2): 389-391
- L26 Fänge, R. (1950) Carbonic anhydrase and gas secretion in the swimbladder of fishes. XVIII Int. *Physiol. Congr.*: 192-193
- L27 Fänge, R. (1953) The mechanism of gas transport in the euphysoclist swimbladder. *Acta physiol. scand.*, 30 (Suppl. 110): 1-133
- L28 Fairbanks, M.B. (1968) Characterization of the normal ocular oxygen tension in the eye of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) using a micro oxygen polarographic electrode. Thesis (M.S.), Michigan State University, East Lansing, Michigan, U.S.A.
- L29 Fairbanks, M.B., Hoffert, J.R. and Fromm, P.O. (1969) The dependence of the oxygen-concentrating mechanism of the teleost eye (*Salmo gairdneri*) on the enzyme carbonic anhydrase. *J. Gen. Physiol.*, 54: 203-211
- L30 Fairbanks, M.B., Hoffert, J.R. and Fromm, P.O. (1974) Short circuiting of the ocular oxygen concentrating mechanism in the teleost *Salmo gairdneri* using carbonic anhydrase inhibitors. *J. Gen. Physiol.*, 64: 263-273
- L31 Farhi, L.E. (1965) Continuous duty tonometer system. *J. Appl. Physiol.*, 20(5): 1098 - 1101
- L32 Fonner, D.B., Hoffert, J.R. and Fromm, P.O. (1973) The importance of the counter current oxygen multiplier mechanism in maintaining retinal function in the teleost. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 43: 559-567
- L33 Fry, F.E.J. (1957) The aquatic respiration of fish. in: Brown, M.E. (ed.) *Physiology of Fishes*, Ch. I, pp. 1-63, Academic Press, New York
- L34 Gallagher, P., Thorarensen, H. and Farrell, A.P. (1995) Hematocrit in oxygen-transport and swimming in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Respir. Physiol.*, 102(2-3): 279-292

-
- L35 Gilmour, K.M. and Perry, S.F. (1996) The effects of experimental anemia on CO₂ excretion *in vitro* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Physiol. Biochem., 15 (1): 83-94
- L36 Goodrich, E.S. (1930) Studies on the structure and development of vertebrates. MacMillan & Co., London, (repr. Dover Publ., Inc., New York, 1958)
- L37 Gouras, P. and Hoff, M. (1970) Retinal function in an isolated, perfused mammalian eye. Invest. Ophthalmol., 9: 388-399
- L38 Hamasaki, D.I. and Bridges, C.D.B. (1965) Properties of the electroretinogram in three elasmobranch species. Vision Res. 5: 483-496
- L39 Haupt, H., Scheibe, F., Ludwig, C. and Petzold, D. (1991) Measurements of perilymphatic oxygen tension in guinea pigs exposed to loud sound. Eur. Arch. Otorhinolaryngol., 248: 413-416
- L40 Heisler, N. (1978) Bicarbonate exchange between body compartments after changes of temperature in the larger spotted dogfish (*Scyliorhinus stellaris*). Respir. Physiol., 33: 145-160
- L41 Heisler, N. (ed.) (1986) Acid-Base-Regulation in Animals. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York
- L42 Henry, R.P. and Heming, T.A. (1998) Carbonic anhydrase and respiratory gas exchange. in: Perry, S.F. and Tufts, B.L. (eds.) Fish Physiology, Vol 17 „Fish Respiration“, Ch. 3, pp. 75-111, Academic Press, San Diego
- L43 Hetz, S.K. (1994) Untersuchungen zu Atmung, Kreislauf und Säure-Basen-Regulation an Puppen der tropischen Schmetterlingsgattungen *Ornithoptera*, *Troides* und *Attacus*. Dissertation, Universität Erlangen.
- L44 Hoagland, T.M., Weaver, L. Jr., Conlon, J.M., Wang, Y. and Olson, K.R. (2000) Effects of endothelin-1 and homologous trout endothelin on cardiovascular function in rainbow trout. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol., 278: R460-R468
- L45 Hofer, R. and Gatumu, E. (1994) Necrosis of trout retina (*Oncorhynchus mykiss*) after sublethal exposure to nitrite. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 26: 119-123
- L46 Hoffert, J.R. (1966) Observations on ocular fluid dynamics and carbonic anhydrase in tissues of lake trout (*Salvelinus namaycush*). Comp. Biochem. Physiol., 17: 107-114
- L47 Hoffert, J.R. and Fromm, P.O. (1966) Effect of carbonic anhydrase inhibition on aqueous humor and blood bicarbonate ion in the teleost (*Salvelinus namaycush*). Comp. Biochem. Physiol., 18: 333-340
- L48 Hoffert, J.R. and Fromm, P.O. (1970) Quantitative aspects of glucose catabolism by rainbow and lake trout ocular tissues including alterations resulting from various pathological conditions. Exp. Eye Res., 10: 263-272
- L49 Hoffert, J.R., Fairbanks, M.B. and Fromm, P.O. (1971) Ocular oxygen concentrations accompanying severe chronic ophthalmic pathology in the lake trout (*Salvelinus namaycush*). Comp. Biochem. Physiol. A, 39: 137-145
- L50 Hoffert, J.R. and Ubels, J.L. (1979) The intraocular PO₂ and electroretinogram of the trout as affected by temperature and ventilatory flow. Comp. Biochem. Physiol. A, 62: 563-568
- L51 Holeton, G.F. and Randall, D.J. (1967a) Changes in blood pressure in the rainbow trout during hypoxia. J. exp. Biol., 46: 297-305
-

- L52 Høleton, G.F. and Randall, D.J. (1967b) The effect of hypoxia upon the partial pressure of gases in the blood and water afferent and efferent to the gills of rainbow trout. *J. exp. Biol.*, 46: 317-327
- L53 Høleton, G.F., Neumann, P. and Heisler, N. (1983) Branchial ion exchange and acid-base regulation after strenuous exercise in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Respir. Physiol.*, 51: 303-318
- L54 Ingermann, R.L. (1982) Physiological significance of Root effect hemoglobins in trout. *Respir. Physiol.*, 49: 1-10
- L55 Ishimatsu, A., Iwama, G.K. and Heisler, N. (1988) *In vivo* analysis of partitioning of cardiac output between systemic and central venous sinus circuits in rainbow trout: A new approach using chronic cannulation of the branchial vein. *J. exp. Biol.*, 137: 75-88
- L56 Janssen, R.G. and Randall, D.J. (1975) The effect of changes in pH and PCO_2 in blood and water on breathing in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Respir. Physiol.*, 25: 235-245
- L57 Jones, T.W. (1838) On the so-called choroid gland or choroid muscle of the fish's eye. *London Med. Gaz.*, 21: 650-652
- L58 Kågström, J., Axelsson, M. and Holmgren, S. (1994) Cardiovascular responses to scyliorhinin I and II in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *in vivo* and *in vitro*. *J. exp. Biol.*, 191: 155-166
- L59 Kågström, J., Axelsson, M., Jensen, J., Farrell, A.P. and Holmgren, S. (1996a) Vasoactivity and immunoreactivity of fish tachykinins in the vascular system of the spiny dogfish. *Am. J. Physiol.* 270 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 39): R585-R593
- L60 Kågström, J., Holmgren, S., Olson, K.R., Conlon, J.M. and Jensen, J. (1996b) Vasoconstrictive effects of native tachykinins in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Peptides*, 17(1): 39-45
- L61 Keen, J.E. and Farrell, A.P. (1994) Maximum prolonged swimming speed and maximum cardiac performance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, acclimated to two different water temperatures. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 108(2-3): 287-295
- L62 Kinkead, R. and Perry, S.F. (1991) The effects of catecholamines on ventilation in rainbow trout during hypoxia or hypercapnia. *Respir. Physiol.*, 84(1): 77-92
- L63 Kobayashi, H., Pelster, B. and Scheid, P. (1989a) Water and lactate movement in the swimbladder of the eel, *Anguilla anguilla*. *Respir. Physiol.*, 78: 45-57
- L64 Kobayashi, H., Pelster, B. and Scheid, P. (1989b) Solute back-diffusion raises the gas concentrating efficiency in counter current flow. *Respir. Physiol.*, 78: 59-71
- L65 Kobayashi, H., Pelster, B. and Scheid, P. (1990) CO_2 back-diffusion in the rete aids O_2 secretion in the swimbladder of the eel. *Respir. Physiol.*, 79: 231-242
- L66 Kodama, T., Reddy, V.N. and Macri, F.J. (1983) The arterially perfused enucleated rabbit eye as a model for studying aqueous humor formation. *Ophthalmic Res.*, 15: 225-233
- L67 Krogh, A. and Leitch, I. (1919) The respiratory function of the blood in fishes. *J. Physiol.*, 52: 288-300
- L68 Kuhn, W. and Kuhn, H.J. (1961) Multiplikation von Aussalz- und anderen Einzeleffekten für die Bereitung hoher Gasdrücke in der Schwimmblase. *Z. Elektrochem.*, 65: 426-439

- L69 Kuhn, W., Ramel, A., Kuhn, H.J. and Marti, E. (1963) The filling mechanism of the swimbladder. *Experientia*, 19(10): 497-511
- L70 Larsen, B.K. and Jensen, F.B. (1993) Arterial PO_2 , acid-base status, and red-cell nucleoside triphosphates in rainbow trout transferred from fresh-water to 20-percent sea-water. *J. Fish Biol.*, 42(4): 611-614
- L71 Larsen, B.K. and Jensen, F.B. (1997) Influence of ionic composition on acid-base regulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to environmental hypercapnia. *Fish Physiol. Biochem.*, 16(2): 157-170
- L72 Laurent, P. and Dunel-Erb, S. (1984) The pseudobranch: Morphology and function. in: Hoar, W.S. and Randall, D.J. (eds.) *Fish physiology*, Vol. XB, Ch. 9, pp. 285-323. Academic Press, Orlando
- L73 Leiner, M. (1938) Die Augenkiemendrüse (Pseudobranchie) der Knochenfische. Experimentelle Untersuchungen über ihre physiologische Bedeutung. *Z. Vergl. Physiol.*, 26: 416-466
- L74 Lele, P.P. and Grimes, P. (1960) The role of neural mechanisms in the regulation of intraocular pressure in the cat. *Exp. Neurol.* 2, 199-220.
- L75 Le Mével, J.-C., Olson, K.R., Conklin, D., Waugh, D., Smith, D.D., Vaudry, H. and Conlon, J.M. (1996) Cardiovascular actions of trout urotensin II in the conscious trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Am. J. Physiol.* 271 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 40): R1335-R1343
- L76 Le Mével, J.-C., Delarue, C., Mabin, D. and Vaudry, H. (1999) Central and peripheral administration of endothelin-1 induces an increase in blood-pressure in conscious trout. *Amer. J. Physiol.*, 276(4): R1010-R1017
- L77 Lindemann, V.F. (1943) A comparative study of the oxygen consumption of the vertebrate retina, with especial reference to the nucleo-protoplasmic ratio. *Am. J. Physiol.*, 139: 9-16
- L78 Linsenmeier, R.A. and Yancey, C.M. (1987) Improved fabrication of double-barreled recessed cathode O_2 microelectrodes. *J. Appl. Physiol.*, 63(6): 2554-2557
- L79 Lübbbers, D.W., Baumgärtl, H., Fabel, H., Huch, A., Kessler, M., Kunze, K., Riemann, H., Seiler, D. and Schuchhardt, S. (1969) Principle of construction and application of various platinum electrodes. *Progr. Resp. Res.*, 3: 136-146
- L80 Macri, F.J. (1959) Acetazolamide and the venous pressure of the cat eye. *The Pharmacologist* 1 (2):
- L81 Macri, F.J. (1960) Acetazolamide and the venous pressure of the eye. *Arch. Ophthalmol.*, 63: 953-965.
- L82 Maetz, J. (1956) Le rôle biologique de l'anhydrase carbonique chez quelques téléostéens. *Bull. Biol. France, Belgique (Paris)*, Supplement 40: 1-129
- L83 Marshall, N.B. (1960) Swim bladder structure of deep-sea fishes in relation to their systematics and biology. *Discovery Rep.*, 31: 1-122
- L84 Maxime, V., Pennec, J.P. and Peyraud, C. (1991) Effects of direct transfer from freshwater to seawater on respiratory and circulatory variables and acid-base status in rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B*, 161(6): 557-568
- L85 Michaelson, I.C. (1954) *Retinal circulation in man and animals*. Charles C. Thomas, Springfield, Ill.

- L86 Müller, J. (1839) Vergleichende Anatomie der Myxinoiden. III. Über das Gefäßsystem. Abh. K. Dt. Akad. Wiss. Berlin, 175-303
- L87 Müller, R. (1995) Untersuchungen zur Funktion der Pseudobranchien bei Teleosteen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- L88 Nakashima, M. (1928) Stoffwechsel der Fischnetzhaute bei verschiedenen Temperaturen. Biochem. Zeitschr., 204: 479-481
- L89 Neumann, P., Heisler, N. and Høle, G.F. (1983) Cardiac output and regional blood flow in gills and muscles after exhaustive exercise in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. exp. Biol., 105: 1-14
- L90 Nicol, J.A.C. (1989) The Eyes of Fishes, Clarendon Press, Oxford, New York, Toronto
- L91 Niemeyer, G. (1973) Intracellular recording from the isolated perfused mammalian eye. Vision Res., 13: 1613-1618
- L92 Niemeyer, G. (1975) The function of the retina in the perfused eye. Doc. Ophthalmol., 39: 53-116
- L93 Niemeyer, G. (1981) Neurobiology of perfused mammalian eyes. J. Neurosci. Methods, 3: 317-331
- L94 Niemeyer, G. (1989) The optic nerve action potential: a monitor for pharmacological effects in the perfused cat eye. in: Cordella, M. and Macaluso, C. (eds.), Le indagini elettrofisiologiche nelle affezioni del nervo ottico, pp. 65-80. Parma: University of Parma.
- L95 Nikinmaa, M., Steffensen, J.F., Tufts, B.L. and Randall, D.J. (1987) Control of red cell volume and pH in trout: effects of isoproterenol, transport inhibitors, and extracellular pH in bicarbonate/carbon dioxide-buffered media. J. Exp. Zool., 242: 273-281
- L96 Ober, E.S. and Sharp, R.E. (1996) A microsensor for direct measurement of O₂ partial pressure within plant tissues. J. Exp. Botany, 47(296): 447-454
- L97 Oyster, C.W. (1999) The Human Eye. Structure and function. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- L98 Pelster, B., Kobayashi, H. and Scheid, P. (1989) Metabolism of the perfused swimbladder of the european eel: oxygen, carbon dioxide, glucose and lactate balance. J. exp. Biol., 144: 495-506
- L99 Pelster, B. and Weber, R.E. (1991) The physiology of the Root effect. Adv. Comp. Environm. Physiol., 8: 51-77
- L100 Pelster, B. and Scheid, P. (1992) The influence of gas gland metabolism and blood flow on gas deposition into the swimbladder of the European eel *Anguilla anguilla*. J. exp. Biol., 173: 205-216
- L101 Pelster, B. and Randall, D. (1998) The physiology of the Root effect. in: Perry, S.F. and Tufts, B.L. (eds.) Fish Physiology, Vol 17 „Fish Respiration“, Ch. 4, pp. 113-139, Academic Press, San Diego
- L102 Perry, S.F., Davie, P.S., Daxboeck, C., Ellis, A.G. and Smith, D.G. (1984) Perfusion methods for the study of gill physiology. in: Hoar, W.S. and Randall, D.J. (ed.) Fish Physiology, Vol XB, Ch. 10, pp. 325-388, Academic Press, New York
- L103 Perry, S.F. and Thomas, S. (1991) The effects of endogenous or exogenous catecholamines on blood respiratory status during acute hypoxia in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Comp. Physiol. B, 161: 489-497

- L104 Perry, S.F. and Gilmour, K.M. (1996) Consequences of catecholamine release on ventilation and blood oxygen transport during hypoxia and hypercapnia in an elasmobranch (*Squalus acanthias*) and a teleost (*Oncorhynchus mykiss*). J. exp. Biol., 199: 2105-2118
- L105 Perry, S.F., Reid, S.G., Wankiewicz, E., Iyer, V. and Gilmour, K.M. (1996) Physiological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to prolonged exposure to soft water. Physiol. Zool., 69(6): 1419-1441
- L106 Perry, S.F., Fritsche, R., Hoagland, T.M., Duff, D.W. and Olson, K.R. (1999) The control of blood pressure during external hypercapnia in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. exp. Biol., 202(16): 2177-2190
- L107 Playle, R.C., Munger, S. and Wood, C.M. (1990) Effects of catecholamines on gas exchange and ventilation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. exp. Biol., 152: 353-367
- L108 Pratt, K.T. and Hoffert, J.R. (1982) Polarographic determination of the normal intraretinal oxygen tension of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (ARVO Suppl.), 22: 178
- L109 Randall, D.J., Smith, L.S. and Brett, J.R. (1965) Dorsal aortic blood pressure recorded from the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Zool., 43: 863-872
- L110 Root, R.W. (1931) The respiratory function of the blood of marine fishes. Biol. Bull., 61: 427-456
- L111 Root, R.W. and Irving, L. (1943) The effect of carbon dioxide and lactic acid on the oxygen-combining power of whole and hemolyzed blood of the marine fish *Tautoga onitis* (Linn). Biol. Bull., 84: 207-212
- L112 Schmidt, R.F. and Thews, G. (1995) Physiologie des Menschen. 26. Aufl., Springer Verlag, Berlin.
- L113 Schneidermann, G. and Goldstick, T.K. (1978) Oxygen electrode design criteria and performance characteristics: recessed cathode. J. Appl. Physiol. (Respir. Environ. Exercise Physiol.), 45(1): 145-154
- L114 Scholander, P.F. and van Dam, L. (1954) Secretion of gases against high pressures in the swimbladder of deep sea fishes. I. Oxygen dissociation in blood. Biol. Bull., 107: 247-259
- L115 Scholander, P.F. (1954) Secretion of gases against high pressures in the swimbladder of deep sea fishes. II. The rete mirabile. Biol. Bull., 107: 260-277
- L116 Scholander, P.F. (1956) Observations on the gas gland in living fish. J. Cell. Comp. Physiol., 48: 523-528
- L117 Scholander, P.F., van Dam, L. and Enns, T. (1956) The source of oxygen secreted into the swimbladder of cod. J. Cell. Comp. Physiol., 48: 517-522
- L118 Seaman, A.J., Rullman, D.R., Lutcher, C.L. and Moffat, C. (1965) The living extracorporeal eye. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 17, Suppl. 84: 101-108
- L119 Smith, F.M. and Jones, D.R. (1982) The effect of changes in blood oxygen-carrying capacity on ventilation volume in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. exp. Biol., 97: 325-334
- L120 Soivio, A., Nynolm, K. and Westman, K. (1975) A technique for repeated sampling of the blood of individual resting fish. J. exp. Biol., 62: 207-217

- L121 Steen, J.B. (1963) The physiology of the swimbladder in the eel *Anguilla vulgaris*. III. The mechanism of gas secretion. *Acta physiol. scand.*, 59: 221-241
- L122 Stevens, E.D. and Randall, D.J. (1967a) Changes in blood pressure, heart rate and breathing rate during moderate swimming activity in rainbow trout. *J. exp. Biol.*, 46: 307-315
- L123 Stevens E.D. and Randall, D.J. (1967b) Changes of gas concentrations in blood and water during moderate swimming activity in rainbow trout. *J. exp. Biol.*, 46: 329-337
- L124 Su, E.-N., Yu, D.-Y., Alder, V.A. and Cringle, S.J. (1994) Vasoactivity in the isolated perfused rat eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35: 1642
- L125 Sundin, L. and Nilsson, S. (1992) Arterio-venous branchial blood flow in the Atlantic cod *Gadus morhua*. *J. exp. Biol.*, 165: 73-84
- L126 Sundin, L., Davison, W., Forster, M. and Axelsson, M. (1998) A role of 5-HT₂ receptors in the gill vasculature of the Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. *J. exp. Biol.*, 201: 2129-2138
- L127 Taylor, S.E., Egginton, S. and Taylor, E.W. (1996) Seasonal temperature acclimatization of rainbow trout: Cardiovascular and morphometric influences on maximal sustainable exercise level. *J. exp. Biol.*, 199(4): 835-845
- L128 Tazawa, Y. and Seaman, A.J. (1969) Recording the electroretinogram in the living extracorporeal eye. *Invest. Ophthalmol.*, 8: 238-239
- L129 Tazawa, Y. and Seaman, A.J. (1972) The electroretinogram of the living extracorporeal bovine eye. The influence of anoxia and hypothermia. *Invest. Ophthalmol.*, 11: 691-698
- L130 Tetens, V. and Christensen, N.J. (1987) Beta-adrenergic control of blood oxygen affinity in acutely hypoxia exposed rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B*, 157: 667-675
- L131 Thomas, S. and Le Ruz, H. (1982) A continuous study of rapid changes in blood acid-base status of trout during variations of water *PCO*₂. *J. Comp. Physiol.*, 148: 123-130
- L132 Thorarensen, H., Gallagher, P. and Farrell, A.P. (1996) Cardiac output in swimming rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, acclimated to seawater. *Physiol. Zool.*, 69(1): 139-153
- L133 Tucker, V.A. (1967) Method for oxygen content and dissociation curves on microliter blood samples. *J. Appl. Physiol.*, 23(3): 410-414
- L134 Wahlqvist, I. (1980) Effects of catecholamines on isolated systemic and branchial vascular beds of the cod, *Gadus morhua*. *J. Comp. Physiol.*, 137: 139-143
- L135 Walsh, P.J. and Milligan, C.L. (1993) Roles of buffering capacity and pentose phosphate pathway activity in the gas gland of the gulf toadfish *Opsanus beta*. *J. exp. Biol.*, 176: 311-316
- L136 Wang, T., Knudsen, P.K., Brauner, C.J., Busk, M., Vijayan, M.M. and Jensen, F.B. (1998) Copper exposure impairs intracellular and extracellular acid-base regulation during hypercapnia in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Comp. Physiol. B (Biochem. Systemic Environ. Physiol.)*, 168(8): 591-599
- L137 Waser, W.P. (1994) Auswirkungen von Druck auf die Gassekretion bei Teleosteen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- L138 Weibel, E.R. (1979) Stereological Methods. Vol. 1, Academic Press, London

-
- L139 Whalen, W.J., Riley, J. and Nair, P.K. (1967) A microelectrode for measuring intracellular PO_2 . J. Appl. Physiol., 23(5): 798-801
- L140 Wilkie, M.P. and Wood, C.M. (1991) Nitrogenous waste excretion, acid-base regulation, and ionoregulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to extremely alkaline water. Physiol. Zool., 64(4): 1069-1086
- L141 Wilkie, M.P. and Wood, C.M. (1995) Recovery from high pH exposure in the rainbow trout: white muscle ammonia storage, ammonia washout, and the restoration of blood chemistry. Physiol. Zool., 68(3): 379-401
- L142 Wittenberg, J.B. and Wittenberg, B.A. (1961). Active transport of oxygen into the eye of fish. Biol. Bull., 121: 379
- L143 Wittenberg, J.B. and Wittenberg, B.A. (1962). Active secretion of oxygen into the eye of fish. Nature, 194: 106-107
- L144 Wittenberg, J.B. and Wittenberg, B.A. (1974). The choroid rete mirabile of the fish eye. I. Oxygen secretion and structure: Comparison with the swimbladder rete mirabile. Biol. Bull., 146: 116-136
- L145 Wittenberg, J.B. and Haedrich, R.L. (1974) The choroid rete mirabile of the fish eye. II. Distribution and relation to the pseudobranch and to the swimbladder rete mirabile. Biol. Bull., 146: 137-156
- L146 Wood, C.M., Hogstrand, C., Galvez, F. and Munger, R.S. (1996) The physiology of waterborne silver toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 1. The effects of ionic Ag^+ . Aquatic Toxicol., 35: 93-109

Anhang

1. Chemikalien, Lösungen und Medien

Alle verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad „zur Analyse“.

Die Medikamente Insuman® Rapid und Pancuronium Curamed® wurden freundlicherweise von der Apotheke des Universitäts-Klinikums Charité, Humboldt-Universität zu Berlin, zur Verfügung gestellt:

- C1 Insuman® Rapid (Hoechst Marion Roussel, Bad Soden, Deutschland). Dieses Präparat wurde dem Forellenringer für die Augenperfusion [C10] zugegeben, um die Aufnahme der Glukose durch das Gewebe zu unterstützen.
- C2 Pancuronium Curamed® (CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Dieses Präparat, ein langwirkendes Muskelrelaxans, wurde insbesondere bei Ableitung des intraretinalen PO_2 zur Relaxation der Forellen eingesetzt, da auch bei hohen Konzentrationen des Betäubungsmittels MS222 die spontanen Ventilationsbewegungen der Fische nicht vollständig unterdrückt werden konnten.

Betäubungsmittel: Zur Anästhesie der Forellen wurde MS222 (3-Aminobenzoic acid ethyl ester methanesulfonate) verwendet. Das Betäubungsmittel wird dem Atemwasser zugegeben und von den Fischen über die Kiemen aufgenommen. Es wurde eine konzentrierte Stammlösung des Betäubungsmittels von 7 g/l angesetzt, die auf einen pH von 7 neutralisiert wurden. Für die unterschiedlichen Verwendungen wurden anschließend folgende Verdünnungen hergestellt:

- C3 20 - 30 mg l⁻¹ MS222, für eine leichte Narkotisierung während des Transports der Fische von den Haltungsräumen in das Labor
- C4 60 - 100 mg l⁻¹ MS222, für eine starke Betäubung während chirurgischer Eingriffe
- C5 25 - 40 mg l⁻¹ MS222, zur Aufrechterhaltung der Narkose während der Experimente nach erfolgten chirurgischen Eingriffen

Forellen-Ringerlösung: als isotone Salzlösung für Injektionen oder Behandlung von Erythrozyten wurde eine Forellen-Ringerlösung nach NIKINMAA *et al.* (1987) eingesetzt. Je nach Versuchsanforderung wurde die Ringerlösung leicht verändert. Bei der Zugabe oder Änderung der Konzentration von Stoffen, die als Na-Salz vorlagen, wurde die NaCl-Konzentration entsprechend geändert.

- C6 Forellen-Ringerlösung: NaCl 145 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1,3 mM, MgCl₂ 1,2 mM, D-(+)-Glukose 7,5 mM, NaHCO₃ 10 mM
- C7 Forellen-Ringerlösung für Blutentnahmen: wie C6 mit 5000 IU Heparin ml⁻¹
- C8 Forellen-Ringerlösung zum Spülen von Kathetern und Verdünnen von Injektionslösungen: wie C6 mit 125 IU Heparin ml⁻¹
- C9 Forellen-Ringerlösung zum Waschen von Blut: wie C6 mit 3 mM Na-Pyruvat und 50 IU Heparin ml⁻¹

- C10 Forellen-Ringerlösung für Augenperfusionen: wie C6 (geänderte Bikarbonatkonzentrationen: 5,4 mM) mit 3 mM Na-Pyruvat, 0,5% Polyvinylpyrrolidone (PVP), 50 IU Heparin ml⁻¹ und 10 IU Insulin l⁻¹
Polyvinylpyrrolidone wurde als hochmolekularer Bestandteil zur Erhöhung des kolloidosmotischen Drucks der Ringerlösung zugegeben (PERRY *et al.*, 1984; PELSTER *et al.*, 1989).
- C11 Forellen-Ringerlösung a für Gefäßausgüsse: wie C6, mit 15000 IU Heparin l⁻¹ und 2,8% (w/v) Nitroprussid-Natrium
- C12 Forellen-Ringerlösung b für Gefäßausgüsse: wie C6, mit 0,5% (w/w) Glutaraldehyd

2. Geräte und Materialien

1. Experimente

1. Gefäßausgüsse

- G1 PE-Schläuche, Portex, Hythe, Kent, England:
PE10: Außendurchmesser: 0,610 mm / Innendurchmesser: 0,279 mm
PE20: Außendurchmesser: 1,092 mm / Innendurchmesser: 0,381 mm
PE50: Außendurchmesser: 0,965 mm / Innendurchmesser: 0,584 mm
PE60: Außendurchmesser: 1,219 mm / Innendurchmesser: 0,762 mm
PE100: Außendurchmesser: 1,524 mm / Innendurchmesser: 0,864 mm
PE200: Außendurchmesser: 1,905 mm / Innendurchmesser: 1,397 mm
- G2 Mercor CL-2R + Katalysator MA, Japan Vilene Company, Ltd., Tokyo, Japan (Bezugsquelle: Otto Nordwald, Hamburg, Deutschland)
- G3 Trockenschrank: Heraeus Kelvitron® t, Typ UT 6120, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

2. Ventilation und Katheterisierung

- G4 Luftpumpe für Ventilation: Modell AC0502-A1017-P1-1051. Nitto Kohki Co Ltd.,
- G5 Umlaufkühler: Typ WK450, Messgerätekwerk Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
- G6 Aquarienpumpe: Typ 1028, Eheim, Deizisau, Deutschland
- G7 Mass Flow Controller: MKS Instruments Deutschland GmbH, München, Deutschland
- G8 CO₂ technischer Qualität, Messer Griesheim, Berlin, Deutschland
PE-Schläuche s. G1
- G9 UHU Kraft, UHU GmbH, Bühl, Deutschland
- G10 Gravurgerät Minimot, Proxxon, Niersbach/Eifel, Deutschland
- G11 Drucksensoren: Typen P23AA, P23Db o. P23BB, Statham, Hato Rey, Puerto Rico
- G12 Druckeichgerät nach Professor O.H. Gauer

3. Flussmessung

- G13 Dopplerkristalle: Iowa Doppler Products, Iowa City, Iowa, USA

- G14 Doppler-Flowmeter: Directional Pulsed Doppler Flowmeter, Model 545C-4; Bioengineering, University of Iowa, Iowa, USA
- G15 Knochenschrauben: Titan CMS 0,9/5 mm, Medicon eG, Tuttlingen, Deutschland
PE-Schläuche s. G1
Drucksensoren s. G11
- G16 Peristaltikpumpe: Typ IP-4, Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland
- G17 Schläuche für Peristaltikpumpe: ENExx, Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland

4. Augeninnendruck

- PE-Schläuche s. G1
Drucksensor s. G11

5. Sauerstoffpartialdruckmessung im Auge

- G18 Elektrochirurgie-Gerät: Erbotom T 175, Erbe Elektromedizin, Tübingen, Deutschland
- G19 Steuereinheit für HS 6 Märzhäuser Mikromanipulator: Eigenbau N. Heisler
- G20 Mikromanipulator: Typ HS 6, Märzhäuser Wetzlar, Wetzlar, Deutschland
- G21 Ophthalmoskopische Linse: Super Pupil XL, 132 dpt, Biomicroscopy Lens JH 0987, Volk Optical Inc., Mentor, OH 44060, U.S.A.

6. ERG-Ableitung

- G22 Teflon-isolierte Silberdrähte: Gi 1106 0,37/0,45 mm, Advent Research Materials, Eynsham Oxon, England
- G23 Mikromanipulator: MM33, Märzhäuser Wetzlar, Wetzlar, Deutschland
- G24 Instrumentenverstärker: INA 116, Burr Brown Int. GmbH, Darmstadt, Deutschland
- G25 LED: Hewlett Packard T-1 $\frac{3}{4}$ (5 mm) Precision Optical Performance AlInGaP LED Lamps, Sunpower Series HMLP-GL10, 9300 mcd bei 20 mA, 590 nm

7. Perfusion isolierter Augen

- G26 Tischzentrifuge: Typ T5, Heinz Janetzki KG, Engelsdorf-Leipzig, DDR
- G27 Farhi-Tonometer: FARHI (1965), Nachbau N. Heisler
- G28 Gasmischpumpen: Typen 1 M 303/a-F u. 2 M 303/a-F, H. Wösthoff GmbH, Bochum, Deutschland
- G29 Filtergaze: Polyester 07-40/25, Maschenweite: 40 μ m, Faden-Ø: 40 μ m, Bückmann GmbH, Mönchengladbach, Deutschland
- G30 Gaze-Halter mit Luer-Lock-Anschlüssen: Millipore Swinnex Ø: 13 mm, Millipore, Eschborn, Deutschland
PE-Schläuche s. G1
Peristaltikpumpe und -schläuche s. G16 und G17
Drucksensoren s. G11

- G31 Miniaturventil: Typ HVP 4-4, Hamilton, Schweiz
Mikromanipulator s. G19 u. G20

2. Analytik

1. pH

- G32 pH-Meter: Blood Mikro-System 3 MK II, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
G33 Eichpuffer: S1500 & S1510, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark

2. Gesamt-Sauerstoffkonzentration

- G34 TasCon Oxygen Content Analyser, Department of Anatomy & Physiology, University of Tasmania, Tasmanien, Australien
G35 Trägergas: N₂ hochrein (5.0), Messer Griesheim, Berlin, Deutschland
G36 Tuckerlösung (TUCKER 1967): 6 g l⁻¹ (18,2 mM) K₃Fe(CN)₆, 0,3 g l⁻¹ Saponin
Miniaturventil: s. G31

3. Gesamt-Kohlendioxid-Konzentration

- G37 Kapillaren: Blutkapillaren für Plasmagewinnung, 6854-599, Compur-Electronic GmbH, München, Deutschland, Hämatokritkapillaren 32 mm / 9 µl, ST 06550A Rev. 04/95
G38 Compur Mikrohämatokritzentrifuge, Compur-Electronic GmbH, München, Deutschland
G39 Ultra-Rot-Absorptions-Spektrometer, URAS 14, Hartmann & Braun, Frankfurt/Main, Deutschland
Mass Flow Controller s. G7
G40 Gase technischer Qualität (Stickstoff, Sauerstoff), Messer Griesheim, Berlin, Deutschland

4. Sauerstoffpartialdruck

- G41 Polarographische Elektrode: Typ E5046, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Gase technischer Qualität zur Eichung s. G40

5. Hämatokrit

Hämatokrit-Zentrifuge und -Röhrchen s. G37 u. G38

3. Herstellung der Sauerstoffmikroelektroden

- G42 Kapillaren: Borosilikat-Glas, ohne Filament, Außendurchmesser 1,0 mm, Innendurchmesser 0,58 mm. GC 100-10, Clark Electrochemical, Pangbourne, Reading, England, UK
G43 Kapillarpuller: Model P-97, Sutter Instruments CO, Novato, Kalifornien, USA
Mikromanipulator s. G23
G44 Legierung zur Füllung der Kapillaren: Bi 44,7% / Pb 22,6% / In 19,1% / Sn 8,3% / Cd 5,3%, Goodfellow GmbH, Bad Nauheim, Deutschland
Trockenschrank s. G3
PE-Schläuche s. G1

- Luftpumpe s. G4
- G45 Plattierungslösung: 5% K[Au(CN)₂] in 200 mM Ammonium-Citrat, pH 6,3
Gasmischpumpe s. G28
Sauerstoff (technisch) s. G40
- G46 Elektronische Bausteine: Operationsverstärker OPA128JM, Instrumentenverstärker INA114, Burr Brown Int. GmbH, Darmstadt, Deutschland

4. Datenerfassung

- G47 A/D-Wandlerkarte: DAS-1602, Keithley Instruments, Inc., Taunton, MA, U.S.A., Messbereich: 0-5 bzw. 0-10 V
- G48 Datenerfassungs-Software: ViewDAC, Keithley Data Acquisition Division, Keithley Instruments, Inc. Taunton, MA, U.S.A. und TestPoint, Capital Equipment Corporation, Billerica, MA, U.S.A.

Fisch blau

Zum Dünsten von Fischen nach der Methode „Fisch blau“ eignen sich Karpfen, Brasse, Forelle, Schleie, Aal und Lachs. Die Haut dieser Fische enthält einen Farbstoff, der durch die Behandlung mit heißem Essig die Blaufärbung bewirkt. Bei Fischen, die nach dieser Methode zubereitet werden, darf die schleimige Haut nur mit nassen Händen angefasst und beim Säubern nicht verletzt werden.

Bei der Zubereitung im Backofen darf die Nachwärme nur kurze Zeit wirken, da die Fischhaut sonst grau und unansehnlich wird.

Forelle blau

4 – 6 Forellen (oder Schleien), Salz, ¼ l Essig, ½ l Wasser, Zitronenscheiben, Petersilie

Fische vorsichtig innen säubern, waschen und nur innen salzen. An der Kopfspitze sowie am Schwanzende mit einer Stopfnadel durchstechen, einen Faden hindurchziehen, Kopf und Schwanz zusammenbinden.

Essig und Wasser erhitzen, Fische damit übergießen und 5 – 10 Minuten stehen lassen. Anschließend auf eine Porzellanplatte geben und im Backofen dünsten. An den wie weiße Perlen herausquellenden Augen und am leichten Herausziehen der Rückenflosse ist zu erkennen, dass der Fisch gar ist.

Mit Zitronenscheiben und Petersilie garnieren

Als Beilage Salzkartoffeln, Kopfsalat und Meerrettichsahne reichen.

Einsetzen: Fettpfanne mit ¾ l heißem Essigwasser, untere Einschubleiste, darüber Rost mit Fischplatte

<i>Dünsten:</i>	<i>180 – 200 °C:</i>	<i>20 – 25 Minuten</i>
	<i>0:</i>	<i>3 – 5 Minuten</i>

Tip: Gefrorene Forellen können in gefrorenem Zustand im Topf in kochendem Sud oder über Dampf in der Deckelpfanne oder in Alufolie im Backofen bereitet werden.